UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER AKTIVITÄTEN VON PHOSPHODIESTERASEN UND DER ADENYLAT CYCLASE AUS HIRNGEWEBE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Axel du Moulin
aus Freiburg i. Brsg.

1978

78 379

UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER AKTIVITÄTEN VON PHOSPHODIESTERASEN UND DER ADENYLAT CYCLASE AUS HIRNGEWEBE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Axel du Moulin
aus Freiburg i. Brsg.

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	30. Juni 1978
Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien	4
2.1.2.	Scintillationsmischungen	5
2.2.	Geräte	5
2.3.	Tiere	6
2.4.	Phosphodiesterasen	7
2.4.1.	Herstellung einer CDR-freien PDE (PDE I)	7
2.4.2.	Herstellung einer CDR unabhängigen PDE (PDE II)	7
2.4.3.	Phosphodiesterasetest	8
2.5.	CDR Präparation	9
2.5.1.	Test auf CDR Aktivität in den Fraktionen von Säuleneluaten	1o
2.6.	Adenylat Cyclase Präparationen	1o
2.6.1.	Partikuläre Adenylat Cyclase	1o
2.6.2.	Solubilisierte Adenylat Cyclase	11
2.6.3.	Test der Adenylat Cyclase	11
2.7.	Quantitative Bestimmung von cAMP	12
2.8.	Standard Nukleotid Bindungstest	14
3.	ERGEBNISSE	16
3.1.	Phosphodiesterasen	16
3.1.1.	CDR abhängige PDE (PDE I)	16

		Seite
3.1.2.	Wirkung von Adenosin auf die PDE I	16
3.1.3.	Untersuchungen mit den PDE Präparationen I und II	18
3.1.3.1.	Die Substratkonstanten der PDE I und PDE II	18
3.1.3.2.	Hemmung der Phosphodiesterasen	19
3.2.	Partikuläre Adenylat Cyclase	21
3.2.1.	Elektronenmikroskopische Aufnahme der partikulären Membranpräparation	21
3.2.2.	Temperaturabhängigkeit der Adenylat Cyclase Aktivität	22
3.2.3.	Stabilität bei $0^{o}C$	23
3.2.4.	Wirkung von Hemmstoffen der PDE auf die Adenylat Cyclase Aktivität	23
3.2.5.	Vergleich verschiedener Methoden zum Beenden der Adenylat Cyclase Reaktion	25
3.2.6.	PDE Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase Präparation	26
3.2.7.	Einfluß eines ATP regenerierenden Systems auf die cAMP Bildung durch die partikuläre Adenylat Cyclase Präparation	28
3.2.8.	Stimulierung der Adenylat Cyclase durch Histamin	29
3.2.9.	Vorinkubation von Hirnhomogenaten mit Histamin	3o
3.2.1o.	Wirkung von Adenosin auf die Adenylat Cyclase Aktivität	32
3.2.11.	Beschallung des Hirnhomogenats	33
3.2.12.	Calcium abhängige Wirkung von GTP auf die Adenylat Cyclase Aktivität	38
3.2.13.	Biphasische Wirkung von Ca^{++}Ionen auf die Adenylat Cyclase Aktivität	38
3.2.14.	Das kinetische Verhalten der Adenylat Cyclase	4o

		Seite
3.3.	Kinetische Untersuchungen mit der Lubrol-PX solubilisierten Adenylat Cyclase	46
3.4.	Bindungsstudien	49
3.4.1.	Graphisches Iterationsverfahren	49
3.4.2.	Bindung von ^{3}H-ATP an eine partikuläre Membranpräparation	52
3.4.2.1.	Zeitabhängigkeit der ^{3}H-ATP Bindung	52
3.4.2.2.	Spezifität der ATP Bindung	53
3.4.2.3.	Abhängigkeit der gebundenen Menge ATP von der Proteinkonzentration	54
3.4.2.4.	Scatchard Darstellung der ^{3}H-ATP Bindung	55
3.4.2.5.	Die Bindung von ATP in Gegenwart von GTP oder GMP-PNP	56
3.4.3.	Bindungsuntersuchungen mit einer Lubrol-PX behandelten Membranpräparation	57
3.4.3.1.	Scatchard Darstellung der ATP Bindung	57
3.4.3.2.	Bindung von ATP in Gegenwart von GMP-PNP	58
3.4.3.3.	Bindung von ^{3}H-AMP-PNP in Gegenwart von GMP-PNP	59
3.4.3.4.	Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GTP, Fluorid, Calcium oder Manganionen	59
3.4.3.5.	Vergleich der Bindung der ^{3}H markierten Nukleotide ATP, AMP-PNP und GMP-PNP	6o
3.4.4.	Untersuchung der Bindung von ^{3}H-ATP an verschiedene Fraktionen, die bei der Herstellung der löslich gemachten Membranpräparation erhalten werden	62
3.4.5.	^{3}H-ATP Bindung an ein Nukleotid bindendes Protein	64
3.4.5.1.	Temperaturabhängigkeit der Bindung von ATP	64

		Seite
3.4.5.2.	Unabhängigkeit der Affinitätskonstanten der ^{3}H-ATP Bindung von der Temperatur und der Inkubationsdauer	66
3.4.5.3.	Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GMP-PNP und Noradrenalin	68
3.4.5.4.	Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GTP und Adenosin	69
3.5.	Präparation des Nukleotid bindenden Proteins	71
3.6.	Beeinflußt das Nukleotid bindende Protein die Adenylat Cyclase Aktivität?	77
4. DISKUSSION		79
4.1.	Phosphodiesterasen	79
4.2.	Adenylat Cyclase	82
4.2.1.	Beeinflussen Hemmstoffe der Phosphodiesterasen die Adenylat Cyclase Aktivität?	82
4.2.2.	Wirkung von Calciumionen auf die Adenylat Cyclase Aktivität unter verschiedenen Bedingungen	83
4.2.3.	Adenosin	84
4.2.4.	Histamin	85
4.3.	Nukleotid bindendes Protein	87
4.4.	Modell zur Regulation der Adenylat Cyclase Aktivität	89
5. ZUSAMMENFASSUNG		1oo
6. LITERATURVERZEICHNIS		1o2
7. ABKÜRZUNGEN		1o9

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden unter Leitung von Herrn Prof. J. Schultz am Institut für Toxikologie und am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. J. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, für seine stete Bereitschaft zu anregender Diskussion und für seine großzügige Unterstützung.

Herrn Dr. C.F. Bardele und Frl. Vees danke ich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, Herrn W. Schocker für die Bestimmung von Noradrenalin.

1. Einleitung

Bei der Untersuchung der glycolytischen Wirkung von Adrenalin in Leberschnitten, erwies sich ein kleines, nur kurz zuvor beschriebenes Molekül (1) als ein wichtiges Mosaiksteinchen in der Regulationskette der Glykolyse:

das Adenosin-3', 5'-Monophosphat (cAMP) (2-5).

Das Enzym, welches aus ATP (richtiger: $MgATP^{2-}$) cAMP bildet, ist die, bis auf eine bislang bekannte Ausnahme bei Brevibakterium liquefaciens (43), membrangebundene Adenylat Cyclase.
Der Abbau des cAMP erfolgt durch Phosphodiesterasen, welche teils löslich, teils membrangebunden sind (6).
Die Adenylat Cyclase kommt in allen bisher untersuchten Eukaryonten vor (8).
Von allen Organen besitzt die Großhirnrinde mit die höchste Adenylat Cyclase Aktivität (8).
Phosphodiesterase Aktivitäten sind erwartungsgemäß in allen Organen vorhanden und ebenfalls in der Cortex cerebri außerordentlich hoch (6).

Das Interesse an der Adenylat Cyclase nahm zu, als gefunden wurde, daß ihre Aktivität auch im zellfreien Zustand (Gewebehomogenat) durch Hormone (z.B. Katecholamine) stimulierbar ist (9,1o). Inzwischen ist von vielen Hormonen (z.B. Glukagon, Sekretin, Vasopressin, Oxytocin, TSH, LH, Prostaglandine, ACTH) bekannt, daß sie die cAMP Bildung stimulieren können (Übersichtsartikel 14-17). Auf diesen Ergebnissen beruht die Beschreibung der Hormone als extrazelluläre "first messenger" und des cAMP als intrazellulären "second mes-

senger". Die Hormonwirkung wird dabei von einem spezifischen Rezeptor auf die Adenylat Cyclase übertragen.

Die hohe Aktivität der Adenylat Cyclase im Gehirn, die Erhöhung des cAMP Spiegels in Gehirnschnitten durch elektrische Stimulation oder depolarisierende Substanzen (Quabain, Veratridin) (4o,92) und wahrscheinliche Neurotransmitter Substanzen (Histamin, Noradrenalin, Serotonin, Dopamin) (13,41,42) lassen vermuten, daß das cAMP eine wichtige Rolle im Nervensystem spielt.

Bei der durch Glukagon stimulierbaren Adenylat Cyclase aus Leberzellmembranen wurde erstmals von Rodbell et al. (18,19) gefunden, daß Nukleotide (ATP, GTP oder das enzymatisch schwer hydrolysierbare GMP-PNP) die Glukagonwirkung verstärken und die zur Stimulation notwendige Hormonkonzentration vermindern.
Dieser Nukleotideffekt wurde auch bei Adenylat Cyclasen gefunden, welche durch Katecholamine (2o-23), Prostaglandine (24), Thyrotropin (25) und Oxytocin (26) stimulierbar sind.
In Fettzellen dagegen, deren Adenylat Cyclase durch Glukagon, ACTH, Sekretin, TSH und Katecholamine aktivierbar ist, vermindert GTP die durch Glukagon, ACTH und Adrenalin (27) stimulierte cAMP Bildung.

Auf eine durch Hormone stimulierbare PDE Aktivität gibt es bisher nur wenige Hinweise. In Fettzellen wird die PDE Aktivität durch Insulin erhöht (11,12).

Eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Adenylat Cyclase scheint das Ca^{++} zu spielen (29,3o). Durch Ca^{++} wird zumindest eine der Iso-Formen der PDE über ein Ca^{++}

bindendes Protein in ihrer Aktivität beeinflußt (31, 32).

Die Änderung des intrazellulären AMP Gehaltes unter verschiedenen Bedingungen wurde in perfundiertem Gewebe (33), in Zellkulturen (34) und in Gewebeschnitten (35-39) untersucht.
Bei den genannten Untersuchungen kann in der Regel die Änderung der cAMP Konzentration einer veränderten Adenylat Cyclase (z.B. bei Hormonen) oder PDE Aktivität nicht zugeschrieben werden.
In zellfreien Präparationen können dagegen beide Aktivitäten nebeneinander bestimmt werden (6,7).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit PDE und der Adenylat Cyclase in zellfreien Präparationen aus Ratten- bzw. Meerschweinchenhirn.
Im ersten Teil wird untersucht, ob sich verschiedene PDE Präparationen gegen PDE Hemmer gleich verhalten und ob die Ergebnisse mit zellfreien Enzymen auf intaktes Gewebe übertragbar sind.
Im zweiten Teil steht nicht die Klärung des gesonderten Effektes einer bestimmten Substanz auf die Adenylat Cyclase im Vordergrund, sondern die Frage, ob sich aus den Veränderungen der Adenylat Cyclase Aktivität, hervorgerufen durch verschiedene Stoffe und unterschiedliche Behandlung bei der Präparation, ein allgemeines Modell der Regulation der Adenylat Cyclase ableiten läßt. Weiterhin soll untersucht werden, ob einige Ergebnisse zur Beeinflussung der cAMP Bildung in Gehirnschnitten auch im zellfreien System erhalten werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Boehringer, Mannheim:	Adenosin-5'-triphosphat, Adenosin-5'-monophosphat, cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat, Guanosin-5'-triphosphat, Guanylylimidodiphosphat, Adenylylimidodiphosphat.
Serva, Heidelberg:	Kreatin Phosphat, Kreatin Kinase, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Polyäthylenglykol, Visking Dialyse Schlauch.
Dt. Pharmacia, Freiburg:	Sephadex G-2oo, Sephadex G-25, Blaue Sepharose, Sephacryl, aktivierte Sepharose 4B, Sepharose 6B.
ICI, Frankfurt:	Lubrol-PX.
Merck, Darmstadt:	EGTA (Äthylenglykol-bis(ß-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure), Mercaptoäthanol, Aluminiumoxid, Naphthalin, Theophyllin, Adenosin, Histaminhydrochlorid, Äthylenglykol, Methanol, Dithiothreit, PPO.
Radiochemical Centre, Amersham, England:	^{3}H-ATP, 24 Ci/mMol, ^{3}H-cAMP, 32 Ci/mMol, ^{3}H-AMP-PNP, 25 Ci/mMol, ^{3}H-GMP-PNP, 11,4 Ci/mMol.
Behringwerke, Marburg:	Rinderserumalbumin.
EGA-Chemie, Steinheim:	Isobutylmethylxanthin.

Hoffmann-La Roche, Nutley, USA:	RO 2o-1724, Diazepam, Chlordiazepoxid.
Squibb, Princeton, USA:	SQ 2o-oo9, SQ 66-oo7.

2.1.2. Scintillationsmischungen

Bray-Scintillationsmischung:	4o ml	Äthylenglykol,
	2oo ml	Methanol,
	176o ml	Dioxan,
	7,6 g	PPO,
	6o g	Naphthalin,
Toluol-Scintillationsmischung:	73o ml	Äthylenglykolmonomethyläther,
	2 l	Toluol,
	11 g	PPO.

2.2 Geräte

G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd:	Branson Ultraschalldesintegrator B-12.
B. Braun, Melsungen:	Dilumatik, Dounce Homogenisatoren.
G.D. Searle, Heusenstamm:	Isocap/3oo Scintillationszähler.
LKB Instrument GmbH, Gräfelfing:	Fraktionssammler Ultra Rac 7ooo, Uvicord II, Chopper Bar Recorder 652o-7/8.
Schleicher & Schüll, Dassel:	Celluloseacetatmembranfilter.
Eppendorf Gerätebau, Hamburg:	Thermostat, Mischer, Zentrifuge.

Beckmann Instruments, München:	Ultrazentrifuge, Modell L5-5o.
Du Pont de Nemours, Bad Nauheim:	Zentrifuge RC-2B.
Dt. Pharmacia, Freiburg:	Peristaltische Pumpe P-3, Chromatographierohre SR 25/1oo, K 5o/1oo, K 9/6o.

2.3. Tiere

Fa. Ivanovas, Kissleg:	Sprague-Dawley Ratten.
Fa. Horn, Niederklein:	Meerschweinchen einer geschlossenen Inzuchtkolonie.

2.4. Phosphodiesterasen

2.4.1. Herstellung einer CDR-freien PDE (PDE I)

Die Präparation einer CDR-freien PDE erfolgte nach der Methode von Teshima et al. (44).
Ratten wurden mit einer Guillotine enthauptet und die Gehirne entnommen. Anschließend wurde die Cortex cerebri präpariert und das Gewebe im dreifachen Volumen Puffer (2o mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM Mercaptoäthanol, o,1 mM EGTA) in einem Elvejhem Potter homogenisiert.
Das Homogenat wurde in einer Ultrazentrifuge 1 h bei $1o^5$ g zentrifugiert.
Der Überstand wurde über Sephadex G-2oo chromatographiert (5 x 1oo cm). Die Säule war mit o.a. Puffer, der zusätzlich noch 1oo mM NaCl enthielt, äquilibriert. Eluiert wurde mit demselben Puffer.
Die Elutionsgeschwindigkeit war 2o ml/h, das Fraktionsvolumen 1o ml.
Die Fraktionen wurden ohne und mit CDR Zusatz auf PDE Aktivität getestet. Die Fraktionen, in denen die CDR abhängige PDE enthalten war, wurden vereinigt und gegen den Homogenisationspuffer (ohne EGTA) dialysiert.
Diese PDE Präparation (PDE I) wurde in kleine Portionen aufgeteilt und bei $-3o^oC$ eingefroren.

2.4.2. Herstellung einer CDR unabhängigen PDE (PDE II)

Die PDE II stellt eine grobe Enzympräparation dar. Rattenhirne wurden mit dem dreifachen Volumen Puffer (6o mM Tris-HCl pH 8.o, 5 mM Mercaptoäthanol) versetzt und in einem Elvejhem Potter homogenisiert. Die Behandlung folgt

der Methode von Chasin et al. (45).
Das Homogenat wurde 3o min bei 4o ooo g zentrifugiert. Mit gesättigter Ammoniumsulfat Lösung wurde der Überstand auf 5o % Sättigung gebracht und 3o min langsam gerührt.
Der Niederschlag wurde in 1o min bei 4o ooo g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2o ml des Homogenisationspuffers gelöst. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt.
Der klare Überstand wurde in kleine Portionen aufgeteilt und bei -3o°C eingefroren.

2.4.3. Phosphodiesterase Test

Der Test auf PDE Aktivität wurde nach Pöch (46) durchgeführt. Er beruht auf einer von Krishna entwickelten Methode zur Bestimmung der Adenylat Cyclase Aktivität (47). Grundlage dafür ist, daß cAMP im Gegensatz zu anderen Nukleotiden durch $ZnSO_4$-$Ba(OH)_2$ Behandlung nicht gefällt wird.
Das Inkubationsmedium enthielt im Endvolumen von 5oo µl (oder einem Mehrfachen) o.2 mM DTT, 1 mM AMP, 3 mM $MgSO_4$, o.1 mM $CaCl_2$, 1o mM Tris-HCl pH 7.4, 6o nCi ^{3}H-cAMP.
Die Substrat- und Proteinkonzentrationen sind in den Legenden angegeben.
Nach einer Vorinkubation von 1o min bei 37°C wurde die Reaktion durch Substratzugabe gestartet.
Der Zusatz von 1 mM AMP schützt das aus ^{3}H-cAMP entstehende radioaktive AMP vor dem Abbau durch Nukleotidasen. AMP verursacht bis zu einer Konzentration von 1o mM keine Produkthemmung (48).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2oo µl $ZnSO_4$ (ca. o.2 M) gestoppt und die Reaktionsgefäße in Eis gestellt. Mit der Zugabe von 2oo µl $Ba(OH)_2$ wurde das Reaktionsprodukt gefällt und der Niederschlag in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert.
Vom Überstand, der das nicht hydrolysierte ^{3}H-cAMP enthält, wurden o.6 ml abgenommen, in Scintillationsgefäße gegeben, mit 5 ml Bray-Lösung versetzt und die Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen. Zur Kontrolle auf die Gesamtradioaktivität diente ein Testansatz ohne PDE Aktivität.
Die $ZnSO_4$ und $Ba(OH)_2$ Lösungen waren so aufeinander eingestellt, daß mit Phenolphthalein beim Zusammengeben der Lösungen eine schwach rosa Färbung auftrat.

2.5. CDR Präparation

Eine einfache CDR Präparation beruht auf der Hitzestabilität dieses Proteins (44).
Zwei Schweinehirne wurden in 5oo ml 2o mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM Mercaptoäthanol homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 h bei 35 ooo g zentrifugiert und der klare Überstand 3 min im kochenden Wasserbad auf 95°C erhitzt. Der nach der Zentrifugation (15 min 35 ooo g) erhaltene Überstand wurde bei -3o°C eingefroren.

2.5.1. Test auf CDR Aktivität in den Fraktionen von Säuleneluaten

Die auf CDR Aktivität zu untersuchenden Proben wurden 3 min auf 95°C erhitzt. Dadurch wurde die PDE dieser Proben inaktiviert. Das stabile CDR Protein bleibt dagegen aktiv.
Aliquote dieser erhitzten Proben wurden mit einer PDE inkubiert, deren Aktivität von der Anwesenheit des CDR Proteins abhängt. Eine solche CDR abhängige PDE, die kein CDR Protein besitzt, ist nahezu inaktiv.
Die Anwesenheit von CDR in den Proben zeigte sich durch Aktivierung dieser PDE im PDE Test.

2.6. Adenylat Cyclase Präparationen

2.6.1. Partikuläre Adenylat Cyclase

Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet, die Gehirne entnommen und in Puffer (0°C) gelegt (48 mM Tris-HCl pH 7.4, 12 mM $MgCl_2$, o.1 mM EGTA).
Die Cortices wurden präpariert, mit dem doppelten Volumen Puffer versetzt und 2o mal in einem Dounce Homogenisator mit S-Kolben homogenisiert.
Das Homogenat wurde bei 1 1oo g 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 mM $KHCO_3$ suspendiert (1o ml/ 1.5 g Hirngewicht) und 2o min bei 12 ooo g zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in 1 mM $KHCO_3$ aufgenommen (4 ml/ 1.5 g Hirngewicht) und im Dounce Homogenisator durch 2o Schläge fein suspendiert. Diese Suspension wurde mit 1 mM $KHCO_3$ auf 7 mg Protein/ml eingestellt.

2.6.2. Solubilisierte Adenylat Cyclase

Die oben erhaltene Suspension der partikulären Adenylat Cyclase wurde mit dem gleichen Volumen 2 %iger Lubrol-PX Lösung in 1 mM $KHCO_3$ versetzt und erneut im Dounce Homogenisator 2o mal homogenisiert.
Diese Lösung wurde 3o min langsam gerührt. Die nicht gelösten Bestandteile wurden in 1 h bei $1o^5$ g abzentrifugiert.
Der klare gelbliche Überstand enthält Adenylat Cyclase Aktivität.
Die Proteinbestimmung erfolgte in Gegenwart von Lubrol-PX, wobei auch den Standard BSA Konzentrationen ungefähr gleichviel Lubrol-PX zugegeben wurde, wie in den zu bestimmenden Proben selbst enthalten war.

2.6.3. Test der Adenylat Cyclase

Üblicherweise wurde die Aktivität der Adenylat Cyclase wie folgt gemessen:
Das Inkubationsvolumen betrug 28o µl (oder ein Mehrfaches) und enthielt 4o mM Tris-HCl pH 7.4, 1o mM $MgCl_2$, o.1 mM EGTA, 1 mM IBMX (als PDE Hemmer), 14 mM Kreatinphosphat, 7o EU Kreatinkinase, 2 mM ATP, 3 mM DTT und 14o µg Protein.
Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrats ATP gestartet.
Nach 1o min wurden je 1oo µl entnommen und diese Aliquote in Eppendorfgefäße gegeben, welche ungefähr 5o mg Aluminiumoxid enthielten. Durch Aluminiumoxid (49,5o) wird die Reaktion sofort gestoppt und das nicht umge-

setzte ATP zu 99 % absorbiert.
Zu diesen 1oo µl wurde noch 1 ml 5o mM Acetatpuffer pH 4.o gegeben. Das Aluminiumoxid wurde abzentrifugiert und vom Überstand je 1o und 2o µl zur cAMP Bestimmung abgenommen.
Als O-Wert wurde eine Inkubation unter identischen Bedingungen mit hitzedenaturierter (95°C) Adenylat Cyclase durchgeführt.
Zur Kontrolle auf die cAMP Ausbeute wurden einem nicht inkubierten Ansatz ohne Adenylat Cyclase so viel cAMP zugegeben, daß in dem zur cAMP Bestimmung abgenommenen Aliquot von 2o µl 2 pMole cAMP enthalten waren. Die Aufarbeitung erfolgte dann wie oben angegeben.
Die Ausbeute war meist > 95 %, daher erfolgte keine Korrektur der erhaltenen Werte.
Abweichungen von den o.a. Inkubationsbedingungen sind bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen gesondert aufgeführt.

2.7. Quantitative Bestimmung von cAMP

Die Bestimmung von cAMP wurde nach der Methode von Gilman (51) unter Berücksichtigung der Untersuchungen von Schwabe (52) durchgeführt.
Sie beruht auf der spezifischen Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit einer cAMP abhängigen Protein Kinase.

a) Bindungstest für bis zu 1.5 pMole cAMP/2o µl Probe:

Der Standard Bindungstest enthielt in einem End-

volumen von 47 µl 5o mM Acetatpuffer pH 4.o, o.2 pMole ^{3}H-cAMP (6.4 nCi) eine der cAMP Konzentration entsprechende Menge Bindungsprotein und bekannte Mengen an nicht markiertem cAMP (o.o6 - o.8 pMole) für die Standard Kurve. Von den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 1o, 15 und 2o µl abgenommen. Der Mittelwert dieser drei Bestimmungen wurde zur weiteren Berechnung benutzt.

b) Bindungstest für bis zu 25 pMole cAMP/2o µl Probe:
Volumen und Puffer wie unter a), jedoch o.7 pMole ^{3}H-cAMP/Test (22.4 nCi) und o.4 - 8.o pMole cAMP für die Standard Kurve. Es wurden Doppelbestimmungen mit je 1o und 2o µl der Probe durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Die Inkubationsdauer betrug ungefähr 15 Stunden bei 0°C. Danach wurden die Inkubationen mit o.8 ml 2o mM Phosphatpuffer pH 6.o versetzt. Das gesamte Volumen wurde durch Zelluloseester Filter abgesaugt. Die Filter wurden anschließend mit 5 ml des obigen Phosphatpuffers gewaschen, nach dem Trocknen mit Toluol Scintillator versetzt und die Radioaktivität in einem Scintillationszähler gemessen.
Zur Berechnung der unbekannten cAMP Konzentration c wurde die Freundlichsche Adsorptionsisotherme benutzt:

$$\log CpM = m \log c + konst.$$

Die Werte für CpM erhält man aus dem Bindungstest, m und die Konstante aus der Standard Kurve.

2.8. Standard Nukleotid Bindungstest

Die Bindung verschiedener Nukleotide an Membranfragmente und lösliche Proteine wurde unter den Inkubationsbedingungen der Adenylat Cyclase, jedoch ohne ATP regenerierendes System und IBMX, durchgeführt.

Der Inkubationspuffer enthielt im Endvolumen von 28o ul 1o mM $MgCl_2$, 4o mM Tris-HCl pH 7.4, 1oo µM EGTA, 2.5 pMole ^{3}H-ATP oder ^{3}H-AMP-PNP (9 nM), 5 pMole bei ^{3}H-GMP-PNP (18 nM) (das sind jeweils ungefähr 35 ooo - 4o ooo CpM) und eine bekannte Menge Protein.
Durch Proteinzugabe wurde die Reaktion gestartet. Die übliche Inkubationstemperatur war 0^oC.
Nach der entsprechenden Inkubationsdauer wurde der Reaktionsansatz mit einer Dilumatik aufgesaugt, über Zelluloseester Filter abgesaugt und das Filter mit 2.5 ml Puffer (0^oC) gewaschen.
Vom Aufsaugen bis zum Abfiltrieren vergingen weniger als 4 sec. Die Filter wurden in Plastik Scintillationsgefäße gegeben, getrocknet und mit 5 ml Toluol Scintillator versetzt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler gemessen.

Um den Anteil der spezifisch gebundenen Menge an ATP zu erhalten, wurde von dem insgesamt gebundenen ATP der unspezifisch gebundene Anteil abgezogen. Diese unspezifisch gebundene Menge ATP wurde auf 2 Arten bestimmt:

1. Bindung von ^{3}H-ATP an hitzedenaturiertes Protein

2. Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart einer 10^5-fach höheren Konzentration von nicht markiertem ATP.

Beide Methoden ergaben dieselbe Menge an unspezifisch gebundenem ATP. Sie lag zwischen 15o - 25o CpM/6o µg Protein, das entspricht etwa 12.5 fMol ATP.

Durch Auftragen der zur Bindung eingesetzten Menge markierten Nukleotids auf ein trockenes Filter wurde die Gesamtradioaktivität bestimmt.
Abweichungen vom Standard Bindungstest (weitere Zusätze, andere Temperaturen, variable Nukleotidkonzentrationen) werden in den Legenden beschrieben.

Sonstiges

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Arbeitsgänge bei $0^{o}C$ durchgeführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (89) mit Rinderserumalbumin als Standard.

3. Ergebnisse

3.1. Phosphodiesterasen

3.1.1. CDR abhängige PDE (PDE I)

Die vom Zusatz des CDR Proteins abhängige PDE wurde von den CDR unabhängigen Phosphodiesterasen durch Gelchromatographie getrennt (Abb. 1).
Aufgetragen wurde der Überstand eines Gehirnhomogenats nach Ultrazentrifugation.
Test der Fraktionen ohne Zusatz von CDR Protein zeigt deutlich zwei Gipfel mit PDE Aktivität bei den Fraktionen 8o bzw. 93. Wird dem Inkubationsmedium noch CDR Protein zugegeben, so ändert sich die Aktivität der ersten beiden Gipfel nicht, aber es erscheint ein neuer Gipfel mit sehr hoher PDE Aktivität. Die höchste Aktivität befindet sich in der Fraktion 112. Die Fraktionen 1o2 - 119 enthalten die CDR abhängige PDE, frei von CDR.

Die Trennung des CDR von der PDE wird durch den Zusatz von EGTA erreicht, da EGTA als Chelatbildner vorhandenes Ca^{++} bindet. Ohne Ca^{++} aber kann sich das CDR Protein nicht an die PDE anlagern (44).

3.1.2. Wirkung von Adenosin auf die PDE I

Adenosin erhöht in vielen Zelltypen die cAMP Konzentration (58). Eine Ursache dafür könnte in der Hemmung einer PDE liegen. Deshalb wurde die CDR abhängige PDE daraufhin untersucht, ob sie durch 1o oder 5o µM Adenosin gehemmt werden kann. Die gewählten Adenosin Konzentrationen liegen im physiologischen Bereich (3 - 4o µM) (59).

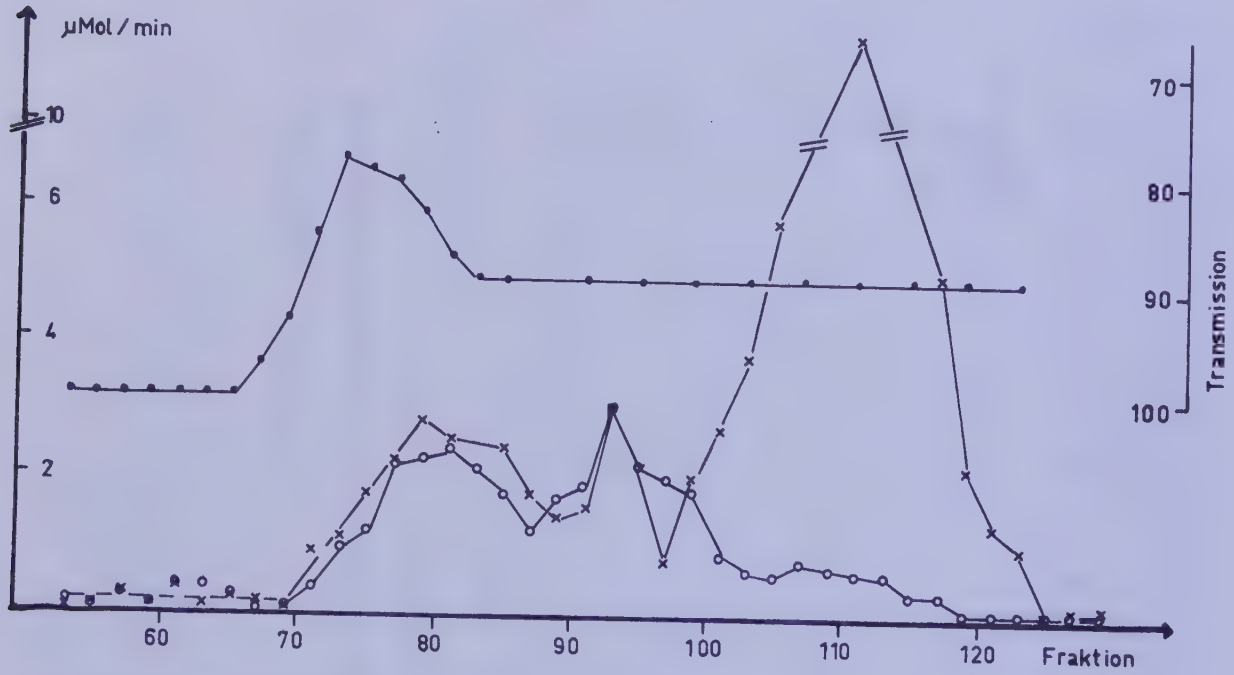


Abb. 1 Anreicherung der CDR abhängigen PDE (PDE I)

Der Ultrazentrifugationsüberstand eines Rattenhirnhomogenats wurde auf eine Sephadex G-2oo Säule (5 x 1oo cm) aufgetragen und mit 2o mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM Mercaptoäthanol und o.1 mM EGTA entwickelt. Die Fließgeschwindigkeit war 2o ml/h, das Fraktionsvolumen betrug 1o ml. 5o µl Aliquote der Fraktionen wurden wie beschrieben auf PDE Aktivität getestet (o-o ohne CDR Zusatz, x-x mit CDR Protein 3.5 µg) mit 5oo µM cAMP als Substrat. •-• Transmission bei 28o nm. Auf der Ordinate ist die Menge hydrolysiertes cAMP angegeben.

Die Menge der hydrolysierten cAMP (Endlagenwerte nach 60 min, 1 ml Tris pH 8,0 und 1 ml Substrat) war ohne Enzym mit steigender Menge [mg] gemäßig mit x ng Protein.

3.1.3. Untersuchungen mit den PDE Präparationen I und II

3.1.3.1. Die Substratkonzentration der PDE I und PDE II

Die beiden PDE Präparationen zeigen unterschiedliches Sättigungsverhalten.

Die K_m-Werte beider Präparationen unterscheiden sich um das 5-fache, der K_m für die PDE I beträgt 1,5 µM, der K_m für die PDE II beträgt 30 µM (Abb. 2).

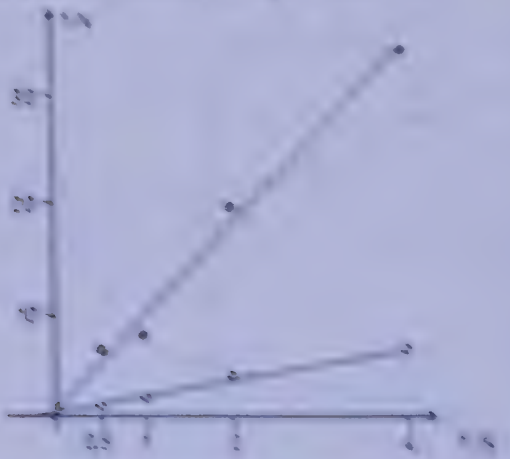


Abb. 2 Lineweaver-Burk Diagramm der cAMP Hydrolyse durch die I (—•—) und PDE II (—•—). Das Inkubationsmedium enthielt in 100 µl: 25 µg PDE I und 33 µg gereinigte PDE Präparation (Abb. 1) bzw. PDE II. Die Reaktion wurde nach 1-5 min beendet. Die Punkte sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen, v = [µl min^{-1}] Hydrolyse von cAMP, s in µM eingesetzt.

3.1.3.2. Hemmung der Phosphodiesterasen

Insgesamt 9 Substanzen wurden auf ihre PDE hemmende Wirkung mit beiden PDE Präparationen untersucht. Als Maß für die Wirksamkeit diente die Konzentration der Hemmstoffe, bei welcher die enzymatische Aktivität um 50 % gehemmt wurde. Diese Konzentration wird als I_{50}-Wert bezeichnet. Phosphodiesterasen besitzen Substrathindungsstellen mit hoher und niederer K_M (37). Aus diesem Grund wurde die Hemmwirkung der Substanzen bei verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht (31). Theophyllin, MD 20-1724 und Clomazepam bewirkten bei einer Konzentration von 50 µM weder Hemmung der PDE I noch der PDE II (500 µM cAMP als Substrat).

Bei der PDE I und 500 µM Substrat hatten Diazepam und Chlordiazepoxid I_{50}-Werte von 100 µM.

Die weiteren Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß die Hemmwirkung der verschiedenen PDE Hemmer abhängig ist von der verwendeten PDE Präparation und von der Substratkonzentration.

Präparationen bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

	Substrat Konzentration (µM)	IBMX I_{50}(µM)	Papaverin I_{50}(µM)	SQ 66-007 I_{50}(µM)	SQ 20-009 I_{50}(µM)	n
PDE I	500	9.25 ± 4.3	48.5 ± 19	35.1 ± 9.7	28.5 ± 4.6	4
PDE I	2.0	24.60 ± 5.3	94.40 ± 3.7	64.00 ± 10.8	n.d.	4
PDE II	500	67.75 ± 6.1[b]	52.87 ± 5.5 n.s.	56.50 ± 10.1[a]	n.d.	5
PDE II	2.0	44.20 ± 5.4[b]	33.70 ± 19.6[b]	19.10 ± 4.6[b]	n.d.	5
PDE I	500	$2p < 0.01$[c]	$2p < 0.01$[c]	$2p < 0.01$[c]		
PDE I	2.0					
PDE II	500	$2p < 0.001$[c]	n.s.[c]	$2p < 0.001$[c]		
PDE II	2.0					

Das Inkubationsvolumen von 1 ml enthielt 36 µg PDE I und 71 µg ungereinigtes CDR Protein oder 420 µg PDE II und jeweils 500 µM oder 2.0 µM cAMP. Die Inkubationen mit 500 µM cAMP wurden nach 20 min, mit 2 µM cAMP nach 5 min beendet.

a: $2p < 0.05$, b: $2p < 0.001$ im Vergleich zur PDE I.
c: Vergleich der I_{50}-Werte bei niederer und hoher Substratkonzentration.
n.s. nicht signifikant. n.d. nicht bestimmt.
n Anzahl der Versuche. Alle Zahlen sind Mittelwerte ± S.D.
Die statistischen Vergleiche der Versuchsergebnisse erfolgten nach dem t-Test von Student.

3.2. Partikuläre Adenylat Cyclase

3.2.1. Elektronenmikroskopische Aufnahme der partikulären Membranpräparation

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die im Adenylat Cyclase Test verwendete partikuläre Membranpräparation.
In dieser recht inhomogenen Präparation sind neben nicht genauer definierbaren Membranfragmenten Nervenzellendigungen in Form von Synaptosomen zu erkennen. In den Synaptosomen sind die synaptischen Vesikeln deutlich zu sehen.

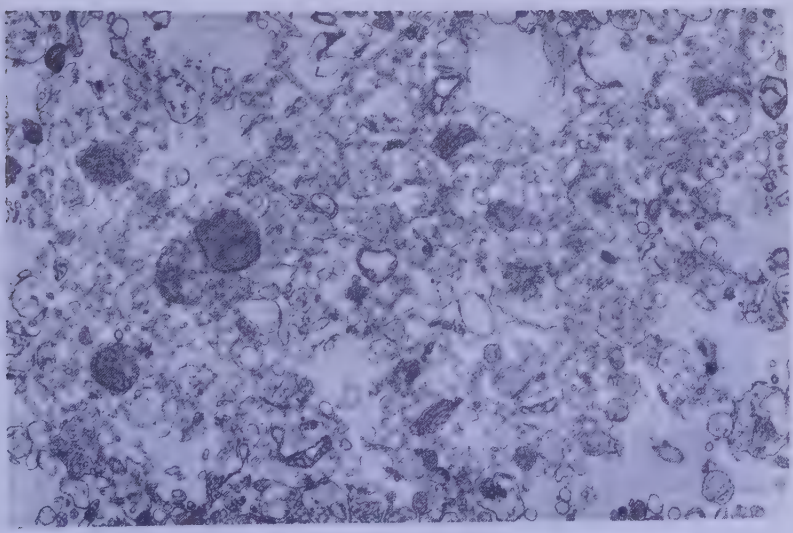


Abb. 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme der partikulären Membranpräparation in 16 ooo facher Endvergrößerung.
(Aufnahme: C.F. Bardele)

Einige in den folgenden Abschnitten geschilderten Experimente mit der partikulären Adenylat Cyclase wurden bei sehr niederen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Das hat den Vorteil, daß die ebenfalls vorhandene PDE Aktivität sehr gering ist und dadurch unberücksichtigt bleiben kann (s.u. 3.2.6.). Auf diese Weise ist es möglich, das System zunächst ohne Zusatz weiterer Komponenten zu untersuchen. Dies ist wichtig, wenn der Einfluß von PDE Hemmern auf die Aktivität der Adenylat Cyclase untersucht werden soll.

3.2.2. Temperaturabhängigkeit der Adenylat Cyclase Aktivität

Die Temperaturabhängigkeit der Adenylat Cyclase zeigt die Abb. 4. Das Temperaturoptimum liegt bei etwa 37°C. Bei höheren Temperaturen fällt die Aktivität steil ab. Schon bei 46°C ist die Adenylat Cyclase nahezu inaktiv. Alle weiteren Inkubationen wurden daher bei 37°C durchgeführt.

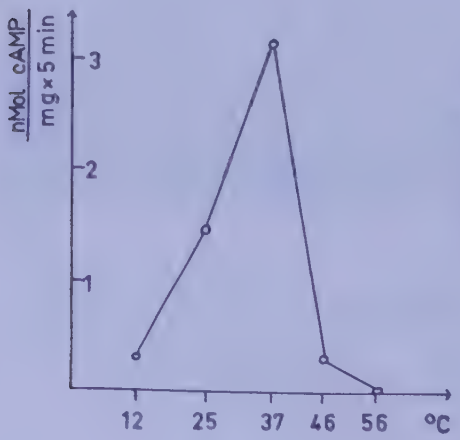


Abb. 4 Temperaturabhängigkeit der Adenylat Cyclase. Die Inkubationen enthielten 7 µg Protein. Nach 5 min Inkubation wurde die Reaktion beendet. Inkubationsbedingungen siehe Methoden.

3.2.3. Stabilität bei 0°C

Die Durchführung der Versuche mit der frisch hergestellten partikulären Adenylat Cyclase nahm zum Teil mehrere Stunden in Anspruch. Die Abb. 5 zeigt das Verhalten der Adenylat Cyclase Aktivität, wenn die Präparation bei 0°C gelagert wird.

Die Aktivität nimmt innerhalb der ersten zwei Stunden um etwa 1o % und nach weiteren drei Stunden um insgesamt 15 % ab. Die Abszisse gibt an, wie lange die Probe im Eis stand. Die Inkubationsdauer bei 37°C war 5 min.

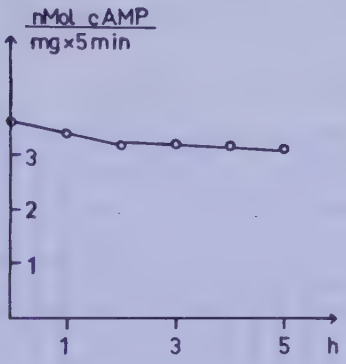


Abb. 5 Stabilität der partikulären Adenylat Cyclase bei längerem Stehen im Eis. Zu den angegebenen Zeiten wurden 2o µl (7 µg Protein) entnommen und die Adenylat Cyclase Aktivität bestimmt.

3.2.4. Wirkung von Hemmstoffen der PDE auf die Adenylat Cyclase Aktivität

Werden Gehirnschnitte zusammen mit PDE Hemmern inkubiert, findet man eine stark gesteigerte cAMP Bildung im Vergleich zu Kontrollen ohne Zusatz der Hemmstoffe (53,54). Neben ihrer Hemmwirkung auf die PDE könnte eine zusätzliche Aktivierung der Adenylat Cyclase durch diese Substanzen für die erhöhte cAMP Bildung verantwortlich sein (28).

Um diese Frage zu klären, wurden relativ hohe Konzentrationen (o.5 mM) von Papaverin, RO 2o-1724, SQ 66-oo7, SQ 2o-oo9, IBMX und Theophyllin ohne und mit Calcium (1o µM) im Medium den Adenylat Cyclase Inkubationen zugesetzt.
Aus der Abb. 6 geht hervor, daß die Adenylat Cyclase Aktivität durch die hier untersuchten Substanzen sowohl ohne wie mit Calcium Zusatz nicht auffallend beeinflußt wird. Eine Aktivierung ist in keinem Fall zu sehen.

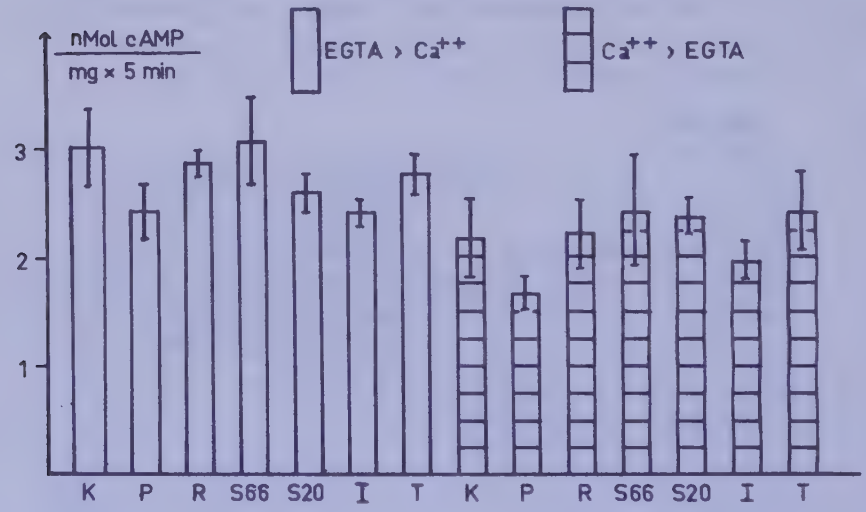


Abb. 6 Einfluß von PDE Hemmern auf die Aktivität der Adenylat Cyclase.
Das Gesamtinkubationsvolumen von 7oo µl enthielt entweder Papaverin (P), RO 2o-1724 (R), SQ 66-oo7 (S 66), SQ 2o-oo9 (S 2o), IBMX (I) oder Theophyllin (T) (jeweils o.5 mM) ohne oder mit Calcium (1o µM über EGTA) im Medium. Kontrolle K. Proteinkonzentration 7 µg/28o µl. Zwischen 1 bis 5 min wurden 1oo µl Aliquote entnommen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen ± SEM.

3.2.5. Vergleich verschiedener Methoden zum Beenden der Adenylat Cyclase Reaktion

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde für die Beendigung der Reaktion Erhitzen auf 95°C angewandt. Um das Erhitzen zu umgehen und die Reaktion schneller zu beenden, wurden zwei weitere Stoppmethoden untersucht.
Da das cAMP unmittelbar aus dem Reaktionsgemisch mit dem Gilman Bindungstest bestimmt wird, konnten dabei allerdings keine denaturierenden Agentien (z.B. SDS) verwendet werden.

Adenylat Cyclase Präparationen wurden wie beschrieben inkubiert und auf drei Arten gestoppt:

1. durch 3minütiges Erhitzen auf 95°C
2. mit o.2 ml eiskaltem Acetatpuffer pH 4.o
3. mit ca. 5o mg trockenem Aluminiumoxid

Zu 1. und 2. wurden nachträglich noch 5o mg Aluminiumoxid zugegeben.

Wie aus der Abb. 7 zu sehen ist, verläuft die cAMP-bildung in allen drei Fällen linear. Die erhaltene Menge an cAMP beim Stoppen durch Erhitzen oder mit Essigsäure ist größer als beim Beenden der Reaktion mit Aluminiumoxid.
Das Stoppen der Reaktion durch Aluminiumoxid erwies sich als einfachste und schnellste Methode, so daß sie bei den folgenden Versuchen angewandt wurde.

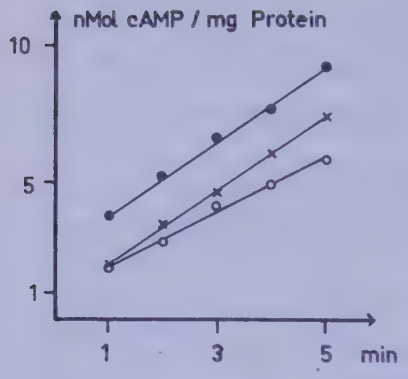


Abb. 7 Vergleich dreier Methoden zum Stoppen der Adenylat Cyclase Reaktion.
Inkubationen mit 7 µg Protein/Test wurden
1. durch 3minütiges Erhitzen auf 95°C •-•,
2. durch o.2 ml eiskalten Acetatpuffer pH 4.o x-x,
3. durch 3o mg trockenes Aluminiumoxid o-o
nach den angegebenen Zeiten gestoppt.
Nach Beenden der Reaktion wurden zu 1. 5o mg Aluminiumoxid und o.2 ml Acetatpuffer, zu 2. 5o mg Aluminiumoxid und zu 3. o.2 ml Acetatpuffer gegeben.

3.2.6. PDE Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase Präparation

In Abb. 8 ist dargestellt, welchen Einfluß IBMX auf die cAMP Bildung hat, wenn 14 oder 14o µg Protein im Adenylat Cyclase Test eingesetzt werden. Sowohl ohne als auch mit IBMX (1 mM) im Inkubationsmedium verläuft die cAMP Bildung linear.
Die cAMP Bildung durch 14 µg Protein ohne IBMX Zusatz unterscheidet sich kaum von der mit IBMX im Inkubationsmedium.
Die PDE Aktivität macht sich stärker bemerkbar, wenn 14o µg Protein eingesetzt werden. Ohne IBMX im Medium ist scheinbar die spezifische Aktivität der Adenylat Cyclase sehr viel geringer mit 14o µg als mit 14 µg Protein. Enthält das Inkubationsmedium 14o µg Protein und IBMX, so nimmt jedoch die gebildete Menge an cAMP zu.

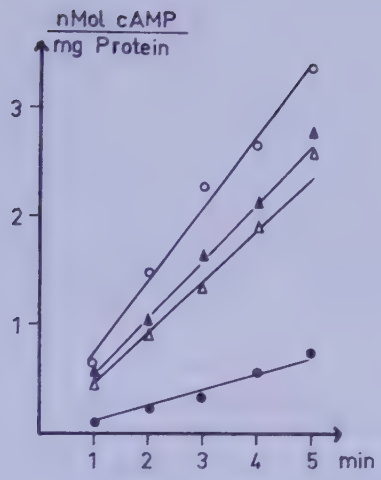


Abb. 8 Einfluß der PDE auf die cAMP Bildung, wenn 14 oder 140 µg Protein einer partikulären Membranpräparation auf Adenylat Cyclase Aktivität untersucht werden und die PDE durch 1 mM IBMX gehemmt wird.

△ - △	14 µg Protein	-	IBMX
▲ - ▲	14 µg Protein	+	IBMX
○ - ○	140 µg Protein	-	IBMX
● - ●	140 µg Protein	+	IBMX

3.2.7. Einfluß eines ATP regenerierenden Systems auf die cAMP Bildung durch die partikuläre Adenylat Cyclase Präparation

Bei hohen Proteinkonzentrationen macht sich auch die Aktivität von ATPasen im Hirnhomogenat bemerkbar, so daß dem Inkubationsmedium zur Erhaltung einer konstanten ATP Konzentration ein ATP regenerierendes System zugesetzt werden muß (52).
Aus Tab. 2 ist zu sehen, daß in Gegenwart eines ATP regenerierenden Systems mehr cAMP gebildet wird, als in Inkubationen, bei denen das ATP nicht regeneriert wird.

	ohne ATP regenerierendes System	mit ATP regenerierendem System
	pMole cAMP/mg Protein x min	
- Ca^{++}	484.o	651.2
+ Ca^{++}	475.2	723.2

Tab. 2 Einfluß eines ATP regenerierenden Systems auf die cAMP Bildung. 14o µg Protein wurden ohne und mit regenerierendem System (14 mM Kreatinphosphat, 7o EU Kreatinkinase) und ohne oder mit 1o µM Ca^{++} über EGTA inkubiert.

3.2.8. Stimulierung der Adenylat Cyclase durch Histamin

In Gehirnschnitten von Meerschweinchen kann die cAMP Bildung durch o.1 mM Histamin um mehr als das 3-fache gesteigert werden (6o). Nach erstmaliger Stimulierung der Adenylat Cyclase in Gehirnschnitten durch Histamin und nachfolgendem Waschen der Schnitte, kann die cAMP Bildung in diesen vorbehandelten Gehirnschnitten durch erneuten Zusatz von Histamin nur noch geringfügig erhöht werden. Die Gehirnschnitte werden für längere Zeit unempfindlich, refraktär, gegen Histamin (6o).
Die Wirkung von Histamin auf die cAMP Bildung in Gehirnschnitten wird synergistisch verstärkt durch Adenosin. In Gegenwart beider Effektoren kann die cAMP Konzentration auf das 3o-fache der Kontrolle ansteigen (52,56,86).

In Hirnhomogenaten ist die Wirksamkeit von Histamin auf die cAMP Bildung von Präparation zu Präparation verschieden. Die spezifische Aktivität der durch Histamin stimulierten Adenylat Cyclase liegt im Mittel 5o % über dem Kontrollwert.
Im folgenden Versuch wurde geprüft, ob sich eine Änderung der Bedingung zur Herstellung des Hirnhomogenats auf die Histamin Stimulierbarkeit der Adenylat Cyclase auswirkt. Dazu wurden Hirnhomogenate bei verschiedenen Temperaturen (0°C oder 37°C) hergestellt. (Beide Homogenate wurden aus der Cortex je eines ganzen Gehirnes gewonnen. Um mögliche Unterschiede in den Aktivitäten beider Hirne auszuschalten, wurde je eine Hirnhälfte ausgetauscht).

Die Histamin Stimulierbarkeit beider Homogenate beträgt 5o % bezogen auf ihre basalen Aktivitäten (Abb. 9).
Die basalen und Histamin stimulierten Aktivitäten des 37°C Homogenats erreichen aber nur noch 17 % der entsprechenden Aktivitäten des 0°C Homogenats.
Die Temperatur bei der Homogenisation der Cortex hat demnach keinen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der Adenylat Cyclase durch Histamin, wohl aber auf deren Gesamtaktivität.

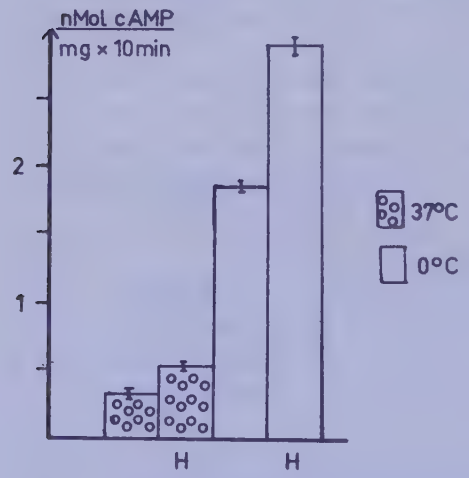


Abb. 9 Vergleich der basalen und Histamin (H) stimulierten Aktivitäten der Adenylat Cyclase in Hirnhomogenaten, die bei 37° oder 0°C hergestellt wurden. Histaminkonzentration o.1 mM.

3.2.9. Vorinkubation von Hirnhomogenaten mit Histamin

Durch Vorinkubation eines Hirnhomogenats mit Histamin sollte untersucht werden, ob die Adenylat Cyclase des Homogenats, ähnlich wie in Gehirnschnitten, refraktär gegen Histamin wird.

Von einem Hirnhomogenat wurden 2ml zu je 26 ml Inkubationsmedium (ohne ATP regenerierendes System und IBMX) gegeben, welches

a) 2 mM ATP bzw.

b) 2 mM ATP und o.1 mM Histamin

enthielt. Das Resthomogenat wurde bei $0^{\circ}C$ aufbewahrt (Kontrolle).

Die Mischungen a und b wurden 1o min bei $37^{\circ}C$ inkubiert, danach auf $0^{\circ}C$ abgekühlt und 1o min bei 4o ooo g zentrifugiert. Nach dem Waschen der Sedimente mit je 2o ml 1 mM $KHCO_3$ wurde erneut zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 1.9 ml 1 mM $KHCO_3$ aufgenommen und im Dounce Homogenisator gut suspendiert.

Das Kontrollhomogenat und die vorbehandelten Homogenate a und b wurden im Adenylat Cyclase Test ohne oder mit Histamin (o.1 mM) im Medium inkubiert.

	basal	H o.1 mM	A o.1 µM	A+H o.1 µM o.1 mM	A 1 mM	A+H 1.o mM o.1 mM
		pMole cAMP / mg Protein x min				
K.	1o67	123o	895	1o97	379	381
a	745	963	574	789		
b	721	994	59o	861		

Tab. 3 Vergleich der Histamin Stimulierung von unbehandeltem Homogenat (Kontrolle K) und von Homogenat, welches mit 2 mM ATP bzw. 2 mM ATP + o.1 mM Histamin (a bzw. b) vorbehandelt wurde. Die Inkubationen enthielten bei der Kontrolle 14o µg, bei a) 98 µg und bei b) 94 µg Protein. Histamin (H), Adenosin (A) in den angegebenen Konzentrationen.

Aus der Tab. 3 ist zu sehen, daß in der Kontrolle die Aktivität der Adenylat Cyclase durch Histamin in diesen Versuchen nur um 15 % gesteigert wird. Bei den vorbehandelten Homogenaten a und b sind zwar die Aktivitäten ohne oder mit Histamin geringer als bei der Kontrolle, aber die Stimulierbarkeit durch Histamin steigt auf 3o bzw. 38 %. Die Adenylat Cyclase in Homogenaten wird also durch die Vorbehandlung gegenüber Histamin nicht refraktär.

Beim Vergleich der basalen Adenylat Cyclase Aktivität mit der durch Adenosin beeinflußten Aktivität ist zu sehen, daß Adenosin die cAMP Bildung vermindert (Tab. 3). Diese Hemmung der cAMP Bildung durch Adenosin tritt auch in Gegenwart von Histamin auf, wie der Vergleich der Aktivitäten zeigt, wenn nur Histamin im Inkubationsmedium vorhanden ist, oder wenn Histamin und Adenosin zugegeben werden (Tab. 3).
Der in Gehirnschnitten bestehende Synergismus zwischen Adenosin und Histamin tritt in Hirnhomogenaten nicht auf.
Bei hohen Adenosinkonzentrationen (1 mM) (die beiden letzten Spalten der Tab. 3) ist die Hemmung der Adenylat Cyclase Aktivität sehr stark, Histamin bleibt ohne Wirkung.

3.2.1o. Wirkung von Adenosin auf die Adenylat Cyclase Aktivität

Im vorigen Versuch wurde gefunden, daß Adenosin die Aktivität der Adenylat Cyclase im zellfreien System vermindert. Im Gegensatz dazu stimuliert es in Gehirn-

schnitten die cAMP Bildung in einer Konzentration von o.1 mM auf mehr als das 1ofache der basalen Konzentration (37-39,56).
Daraufhin wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Adenosin auf die Adenylat Cyclase untersucht. (Abb. 1o).
Bei allen untersuchten Adenosin Konzentrationen verminderte es die Aktivität der Adenylat Cyclase. Eine Hemmwirkung trat schon bei einer Konzentration von 1oo nM auf.

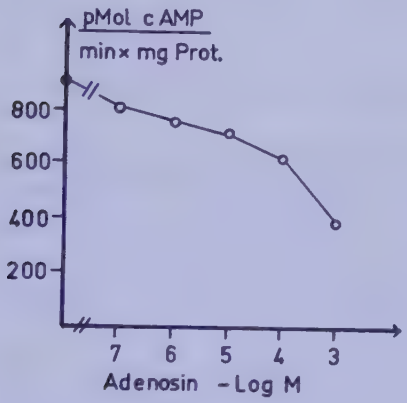


Abb. 10 Hemmung der Adenylat Cyclase Aktivität durch Adenosin. Das Inkubationsmedium enthielt die angegebenen Konzentrationen an Adenosin.

3.2.11. Beschallung des Hirnhomogenats

Die Aktivität der Adenylat Cyclase kann außer durch Hormone auch noch durch Fluorid oder Mangan gesteigert werden (61,65).
Durch unterschiedlich langes Beschallen einer partikulären Adenylat Cyclase Präparation wurde geprüft, wie

sich die basale, die F^-, die Hormon (Histamin, Noradrenalin) und die Mn^{++} stimulierten Aktivitäten verhalten (Abb. 11).
Ein Hirnhomogenat wurde in 7 gleiche Fraktionen aufgeteilt.

Fraktion 1 wurde nicht weiter behandelt.
Fraktion 2 wurde 15 sec beschallt.
Fraktion 3 wurde nicht beschallt, aber zentrifugiert (12 ooo g 2o min).

Die Fraktionen 4-7 wurden 15,3o, 6o und 12o sec beschallt und danach zentrifugiert (12 ooo g 2o min). Beschallt wurde mit der Microspitze auf Stufe 6 unter Eiskühlung.
Jede Fraktion wurde mit den oben angegebenen Substanzen auf die verbliebene Aktivität getestet.
Die Abb. 11 Fraktion 1 zeigt, daß die Adenylat Cyclase durch die Hormone Noradrenalin, Histamin, durch Mn^{++} und F^- in dieser Reihenfolge zunehmend stimulierbar ist.
Bloßes Zentrifugieren und erneutes Suspendieren ändert nichts an den Aktivitäten, d.h. Aktivitäten der Fraktion 1 = Aktivitäten der Fraktion 3. Aktivitätsänderungen in anderen Fraktionen sind demnach nicht auf das zusätzliche Zentrifugieren und Suspendieren zurückzuführen.

In den Fraktionen 4-7 nehmen sowohl die basale, als auch die Hormon- und F^- stimulierten Aktivitäten immer mehr ab. Die Mn^{++} stimulierte Aktivität wird erst nach 12o sec beschallen merklich geringer. Genauere Aussagen lassen sich machen, wenn die Ergebnisse in Form einer e-Funktion dargestellt werden.

Die allgemeine Gleichung lautet:

$$y = ae^{-bt}$$

a entspricht der Differenz der basalen Aktivitäten zum Zeitpunkt 0 ($A_{t=0}$) und der nach 2 Minuten beschallen verbliebenen Aktivität ($A_{t=2}$).

$a = A_{t=0} - A_{t=2}$

b ist die Steigung der Geraden in der logarithmischen Darstellung.

t ist die Dauer der Beschallung in Minuten.

Die Abb. 12 a-d zeigt die gute Übereinstimmung der experimentellen Werte mit den berechneten. Mit Hilfe der Kurven bzw. deren Funktionen kann man $t_{1/2}$ bestimmen. Dieser Wert gibt an, nach welcher Zeit nur noch die Hälfte der Aktivität a vorliegt.

Die Werte von $t_{1/2}$ für die basale, die Noradrenalin und Histamin stimulierten Aktivitäten sind nahezu gleich und sind im Mittel $t_{1/2}$ = o.3 min. Die F^- stimulierte Aktivität hat einen doppelt so großen Wert von $t_{1/2}$=o.67.

Völlig anders verhält sich die Mn^{++} stimulierte Aktivität. Sie zeigt keine exponentielle Abnahme.

Auffallend ist, daß Fraktion 2 nach nur 15 sec Beschallen, ohne Zentrifugation, vergleichbar den Aktivitäten der Fraktion 7 nach 12o sec Beschallen ist.

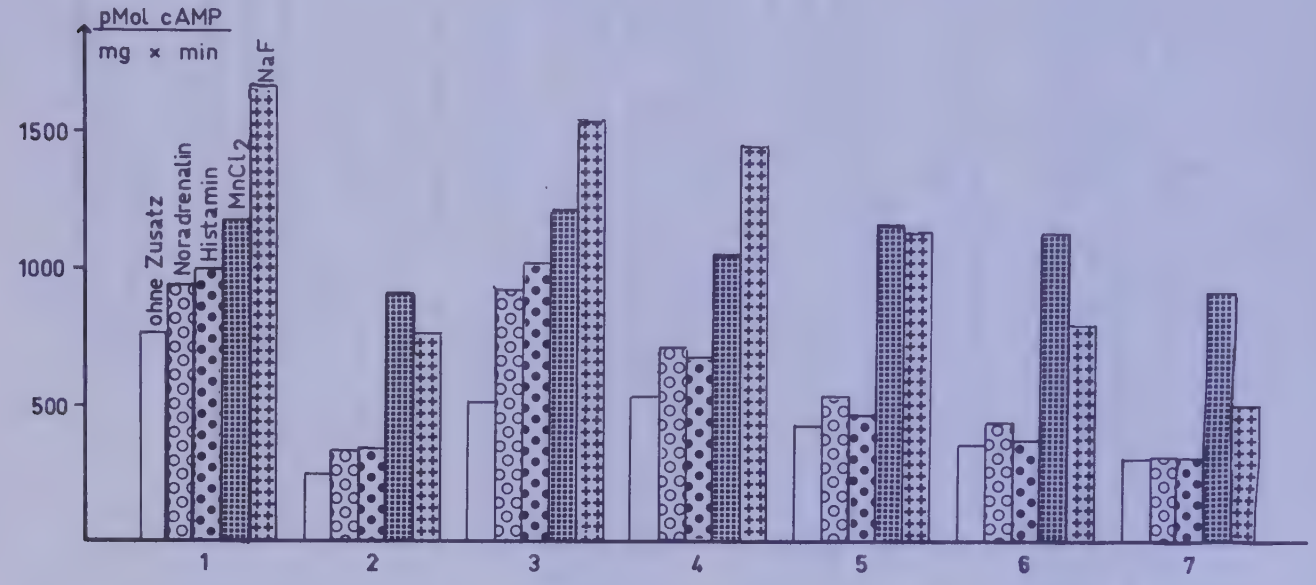


Abb. 11 Wirkung der Beschallung auf die basale, F^-(5mM), Histamin und Noradrenalin (o.1mM) und die Mn^{++}(5mM) stimulierte Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase. Die Fraktionen 1-7 wurden wie im Text beschrieben hergestellt. Die Proteinkonzentrationen pro Ansatz lagen Zwischen 14o ug (Fraktion 1) und 3o ug (Fraktion 7).

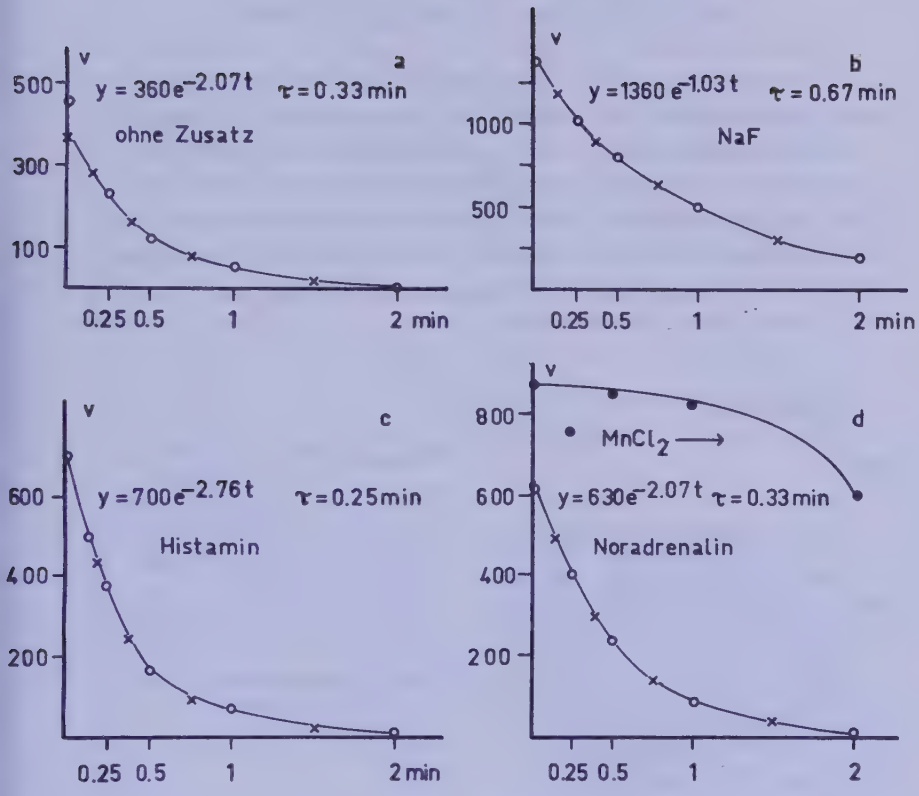


Abb. 12 a-d Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 11 in Form von e-Funktionen. Die Zusätze, Gleichungen und τ Werte sind in den entsprechenden Abbildungen eingetragen. $\tau = t/2$

o-o experimentelle Punkte x-x nach den angegebenen Gleichungen berechnete Punkte.

3.2.12. Calcium abhängige Wirkung von GTP auf die Adenylat Cyclase Aktivität

Die Einwirkung von Ca^{++} und GTP alleine oder zusammen auf die Aktivität der Adenylat Cyclase zeigt die Abb. 13. Die enzymatische Aktivität wird durch 1o µM Ca^{++} (über EGTA) geringfügig aber reproduzierbar gesteigert. GTP (2o µM) hemmt die partikuläre Adenylat Cyclase. Die Kombination von GTP mit Ca^{++} führt zu einer höheren Aktivität als mit Ca^{++} alleine, d.h., in Gegenwart von Ca^{++} wirkt GTP stimulierend.

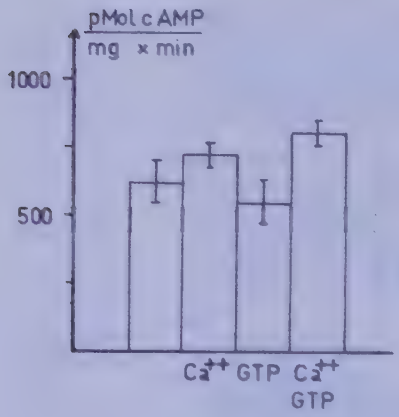


Abb. 13 Wirkung von Ca^{++} (1o µM über EGTA) und GTP (2o µM) alleine oder zusammen auf die Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 Versuchen ± SEM. Inkubationsbedingungen siehe Methoden.

3.2.13. Biphasische Wirkung von Ca^{++} Ionen auf die Adenylat Cyclase Aktivität

Im Folgenden wird die konzentrationsabhängige Wirkung von Ca^{++} auf die Aktivität der Adenylat Cyclase untersucht. Dabei wird die Wirkung von Ca^{++} sowohl auf die

basale als auch auf die GTP oder GMP-PNP beeinflußte Aktivität geprüft. Abb. 14.
Die Punkte über der negativen Abszisse entsprechen der Aktivität, wenn EGTA > Ca^{++} ist. Wie oben ausgeführt, wirkt GTP leicht hemmend. GMP-PNP (2o µM) aktiviert die Adenylat Cyclase sehr stark.
Die basale Aktivität nimmt etwas zu, wenn die Ca^{++} Konzentration gleich der von EGTA wird. Noch höhere Ca^{++} Konzentrationen (über EGTA) haben zunächst keinen Einfluß, steigt die Konzentration aber über 1oo µM, so wird die Adenylat Cyclase gehemmt. Bei einer Ca^{++} Konzentration von 2 mM beträgt die Aktivität in allen drei Fällen nur noch 15 % derjenigen, wenn EGTA gleich Ca^{++} ist, d.h. Ca^{++} wirkt stark hemmend.

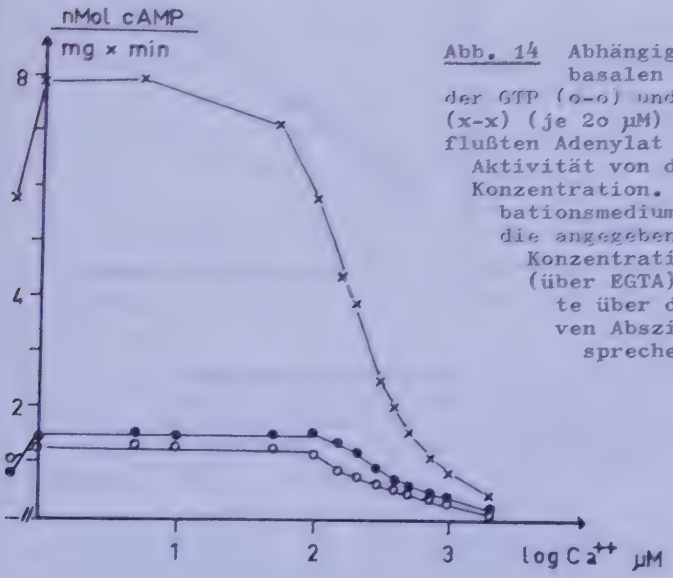


Abb. 14 Abhängigkeit der basalen (o-o), der GTP (o-o) und GMP-PNP (x-x) (je 2o µM) beeinflußten Adenylat Cyclase Aktivität von der Ca^{++} Konzentration. Das Inkubationsmedium enthielt die angegebenen Ca^{++} Konzentrationen (über EGTA). Die Punkte über der negativen Abszisse entsprechen EGTA > Ca^{++}.

3.2.14. Das kinetische Verhalten der Adenylat Cyclase

Die Geschwindigkeit der cAMP Bildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigt die Abb. 15a,b. Im Konzentrationsbereich von 5 - 5oo µM ATP (Abb. 15 a) gehen die Geraden reproduzierbar durch den Nullpunkt. Bei höheren ATP Konzentrationen (1 - 1o mM) (Abb. 15 b) liegen dagegen die Zeitkurven sehr dicht beieinander und schneiden die Ordinate.

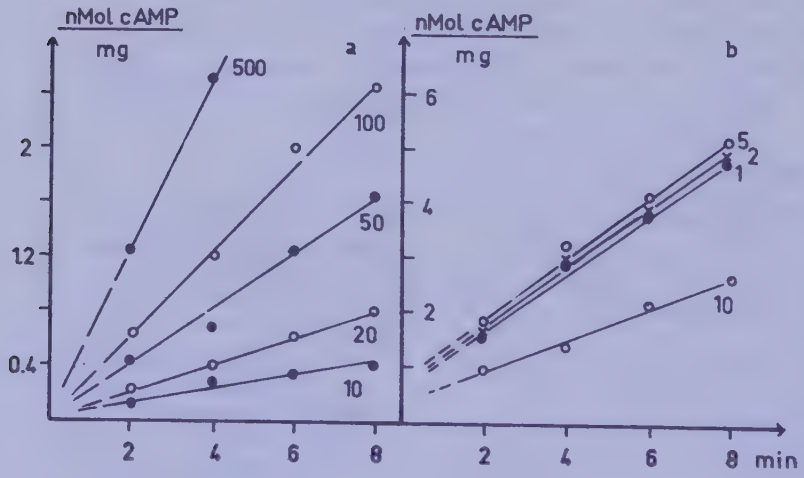


Abb. 15 a, b Abhängigkeit der cAMP Bildung durch die partikuläre Adenylat Cyclase Präparation von der Substratkonzentration. An jeder Geraden ist die entsprechende Substratkonzentration angegeben.
a) 5 - 5oo µM ATP b) 1 - 1o mM ATP EGTA > Ca^{++}

In Abb. 16 a,b sind die Ergebnisse nach Lineweaver-Burk dargestellt. Der lineare Verlauf deutet auf eine Michaelis-Menten Kinetik hin, die bei hoher Substratkonzen-

tration und einer Mg^{++} Konzentration von 1o mM eine geringe Substrathemmung der Aktivität zeigt.
Diese Hemmung ist wahrscheinlich auf freies ATP^{4-} oder $ATPH^{3-}$ zurückzuführen (62). Da bei steigender ATP und konstanter Mg^{++} Konzentration (1o mM) das Verhältnis Mg/ATP abnimmt, das eigentliche Substrat aber $MgATP^{2-}$ ist, steigt die Konzentration des freien ATP an.
Damit eine ausreichende $MgATP^{2-}$ Bildung möglich ist, und wenig $ATPH^{3-}$ vorliegt, sollte daher die Mg^{++} Konzentration mindestens das 3fache der ATP Konzentration betragen.
Wird derselbe Versuch mit 5o mM $MgCl_2$ im Ansatz durchgeführt, tritt keine Hemmung sondern Substratsättigung ein (Abb. 16 b).

Um festzustellen, ob verschiedene Effektoren die Substratkonstante K_M oder die Maximalgeschwindigkeit V_M verändern, wurde die Wirkung von Ca^{++} (1o µM über EGTA), GTP (1oo µM), GMP-PNP (2o µM) und Adenosin (o.5 mM) auf die Adenylat Cyclase Aktivität untersucht. Die Substratkonzentrationen lagen zwischen o.o5 bis o.5 mM ATP, die Mg^{++} Konzentration betrug 1o mM (Abb. 17 a-d).
Der Zusatz von 1o µM Ca^{++} führt in allen Fällen zu einer erhöhten cAMP Bildung.
Das enzymatisch schwer hydrolysierbare GMP-PNP stimuliert die Adenylat Cyclase sehr stark. Die Ca^{++} Abhängigkeit der GMP-PNP Wirkung ist gering.
Die Stimulierung der Adenylat Cyclase Aktivität durch GMP-PNP wird von GTP kompetitiv gehemmt (63,64) (Abb. 17c).
Wird dem Inkubationsmedium Adenosin zugesetzt, so erhält man ohne oder mit Ca^{++} zur Abszisse konvexe Kurven und eine insgesamt erniedrigte enzymatische Aktivität (Abb. 17 d).

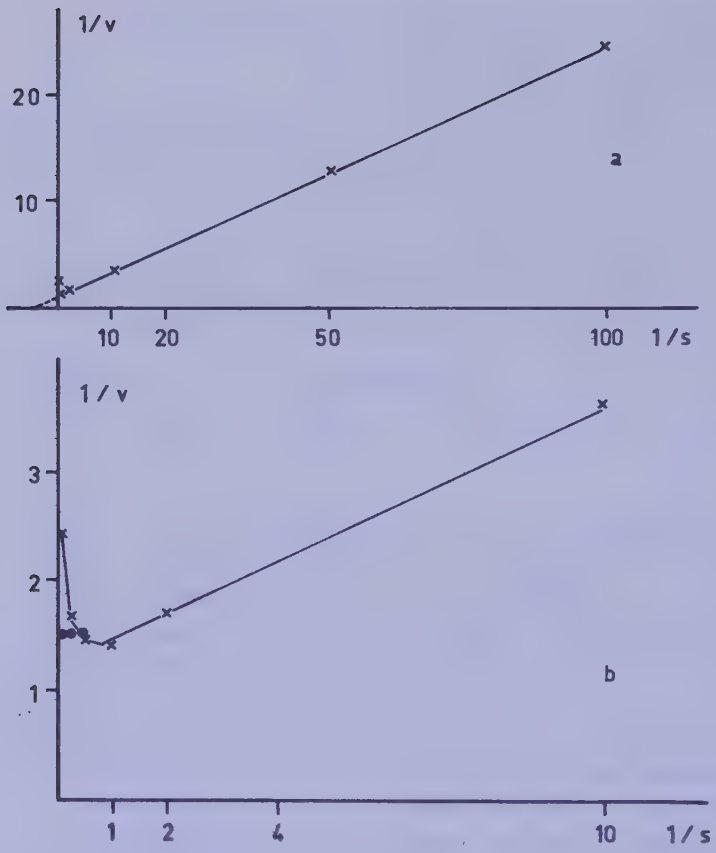
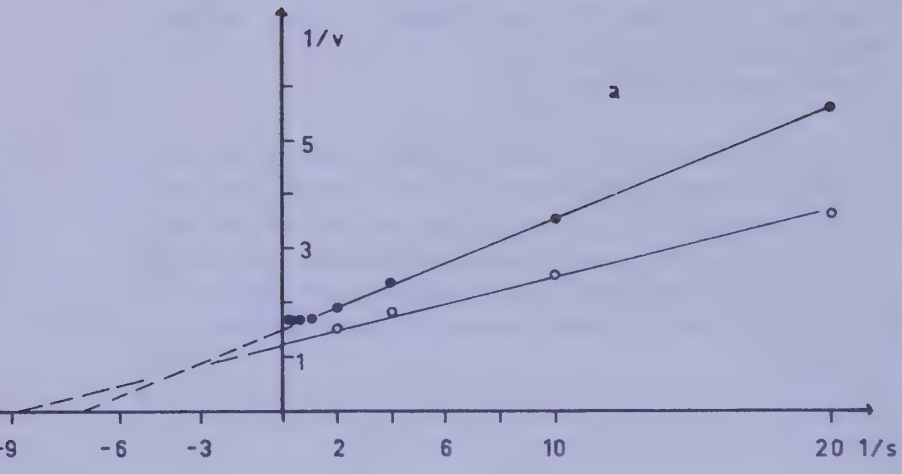


Abb. 16 a, b Die Substratabhängigkeit der Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase in der Lineweaver-Burk Darstellung.
In der Abb. b ist bei gestreckten Achsen die Substrathemmung deutlich zu sehen.
●-● sind Meßwerte mit 5o mM Mg^{++} im Medium. EGTA > Ca^{++}
Die Punkte sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

Wird die Aktivität bei noch höheren ATP Konzentrationen (1 - 1o mM und 5o mM Mg^{++}) gemessen, wie in den Abb. 17 a,c,d bei den Kurven ohne Ca^{++} Zusatz, so tritt Substratsättigung ein .

Die Schnittpunkte der extrapolierten Geraden mit der Abszisse stimmen nahezu überein und ergeben im Mittel einen scheinbaren K_M von o.11 mM. Die Effektoren bewirken somit nur eine Änderung der Maximalgeschwindigkeit, die zwischen o.5 nM/mg Protein x min (Adenosin ohne Ca^{++}) und 3.4 nM/mg Protein x min (GMP-PNP + Ca^{++}) liegt.



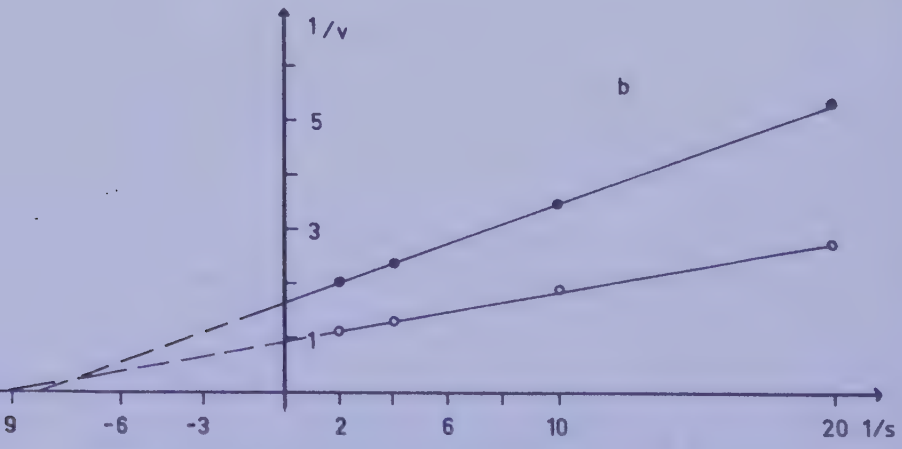


Abb. 17 a, b

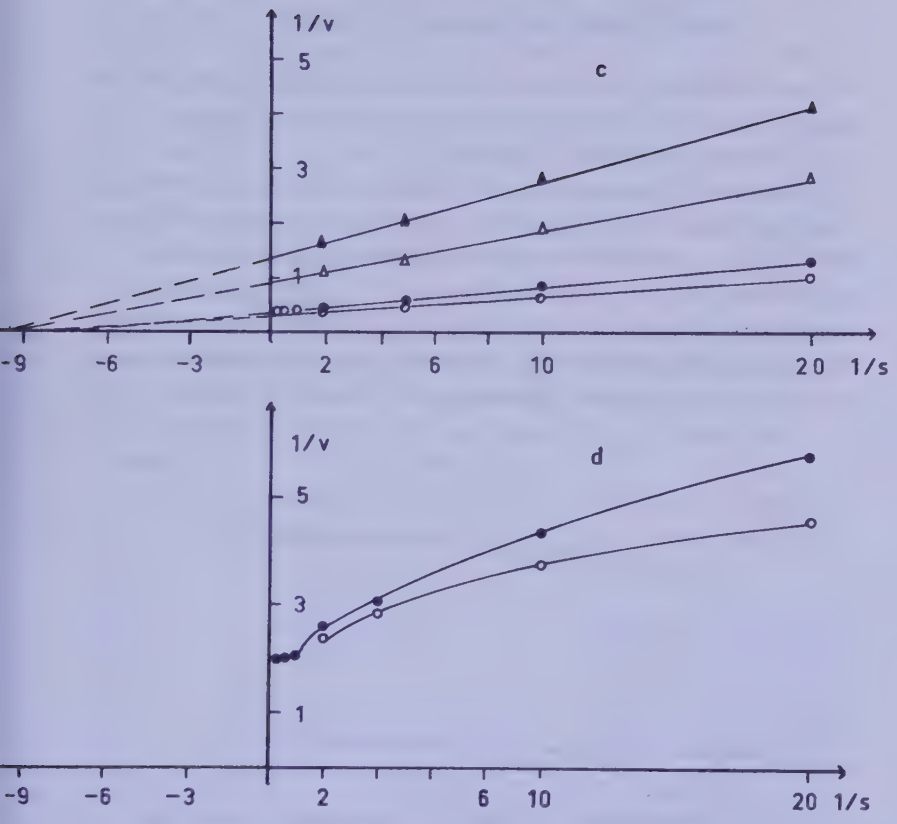


Abb. 17 c,d

Abb. 17 a-d Einfluß von a) 1o µM Ca^{++} (über EGTA)
b) GTP o.1 mM
c) GMP-PNP 2o µM (o-o, ●-●) GMP-PNP + GTP (△-△, ▲-▲) und d) Adenosin o.5 mM auf die Aktivität der partikulären Adenylat Cyclase im Lineweaver-Burk Diagramm. Alle Zusätze zum Standard Inkubationsmedium waren bereits während der Vorinkubation vorhanden. Die Punkte sind Mittelwerte aus 2 bis 4 Versuchen.
●-● EGTA > Ca^{++} o-o 1o µM Ca^{++}

3.3. Kinetische Untersuchungen mit der Lubrol-PX solubilisierten Adenylat Cyclase

Werden die kinetischen Versuche mit der solubilisierten Adenylat Cyclase durchgeführt, ergibt sich eine zur x-Achse konvexe Kurve (Abb. 18).
Das Inkubationsmedium bei Versuchen mit der solubilisierten Adenylat Cyclase enthielt immer 10 uM Ca^{++} über EGTA, da die Aktivität ohne Ca^{++} Zusatz nur etwa 1/6 derjenigen mit Ca^{++} Zusatz beträgt. In Gegenwart von 20 µM GMP-PNP wird der Verlauf linear und gleicht einer Michaelis-Menten Kinetik, wie bei den Versuchen mit der partikulären Adenylat Cyclase ohne Adenosin Zusatz.

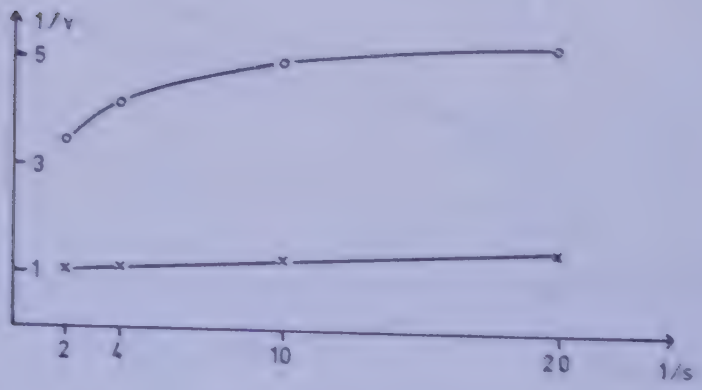


Abb. 18 Abhängigkeit der solubilisierten Adenylat Cyclase Aktivität von der Substratkonzentration. Dem Standard Inkubationsmedium wurden 10 uM Ca^{++} (über EGTA) o-o zugesetzt.
Die Konzentration von GMP-PNP (x-x) betrug 20 uM.

Bei den bisherigen Untersuchungen zum kinetischen Verhalten der Adenylat Cyclase wurde eine konstante Mg^{++} Konzentration beibehalten, wie das in den meisten derartigen Versuchen der Fall war (z.B. 62,75). Mg^{++} und ATP^{4-} ($ATPH^{3-}$) konnten jedoch unterschiedlich auf die partikuläre oder löslich gemachte Adenylat Cyclase einwirken und dadurch das ungleiche Verhalten verursachen. Um darüber Aussagen machen zu können, wurde das Verhältnis $MgATP^{2-}/Mg^{++}$ konstant gehalten. Das Ergebnis zeigt die Abb. 19.

Ohne GMP-PNP im Inkubationsmedium wird eine zur x-Achse konvexe Kurve erhalten, die bei hohen Substratkonzentrationen ihren Verlauf ändert und Substratsättigung zeigt. Bei GMP-PNP Anwesenheit wird eine lineare Michaelis-Menten Kinetik erhalten.

Der Verlauf der Kurven ohne oder mit GMP-PNP gleicht somit dem der Abb. 18.

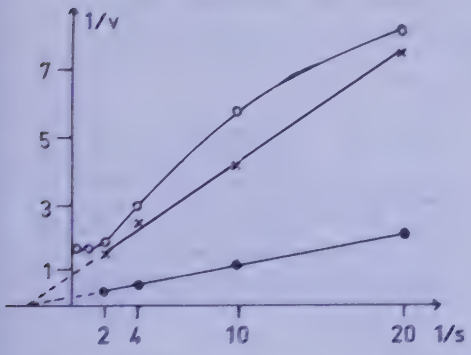


Abb. 19 Inkubationsbedingungen wie in Abb. 18, jedoch mit konstantem Verhältnis MgATP/Mg, hier 1/4 o-o. 2oo nM GMP-PNP x-x, 2o µM GMP-PNP •-•.

MgATP/Mg x K_A= ATP

K_A= 65 ooo 1/M (67)

Der Adenylat Cyclase wird eine allosterische Mg^{++} Bindungsstelle (3o,65) zugeschrieben. Von Cleland und Garbers (66,67) wurden Modelle für den Fall entwickelt, daß

ein Inhibitor in konstanter Proportion zum variablen Substrat gehalten wird. Die experimentell erhaltenen Kurven können dann mit den Modellkurven verglichen werden. Dadurch lassen sich Aussagen über einen möglichen Aktivierungs- (Mg^{++}) und/oder Hemmechanismus (freies ATP^{4-}) machen.

Im Falle der Adenylat Cyclase wurden Modelle zu Grunde gelegt, die einer kompetitiven oder partiell kompetitiven Hemmung durch ATP^{4-} ($ATPH^{3-}$) ohne oder mit Mg^{++} Bindungsstelle entsprechen.

Wird dagegen die ATP^{4-} ($ATPH^{3-}$) Konzentration durch ein gleichbleibendes Verhältnis von $MgATP^{2-}/Mg^{++}$ konstant gehalten, so sollte eine kooperative allosterische Mg^{++} Bindungsstelle leicht zu bemerken sein. Abb. 2o.

Die Kurve ohne Mg^{++} Bindungsstelle ist linear, die Kurve mit Mg^{++} Bindungsstelle ist zur Abszisse konkav. Eine Unterscheidung der Hemmtypen ist in dieser Darstellung nicht möglich. Die Kurven wurden nach (67) berechnet.

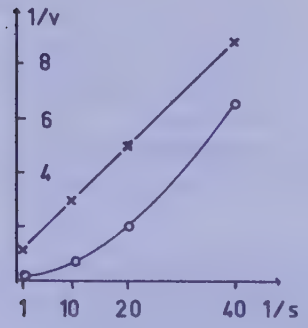


Abb. 20 Modellkurven für das Verhalten der Adenylat Cyclase ohne Mg^{++} Bindungsstelle (x-x) oder mit Mg^{++} Bindungsstelle (o-o). Die Berechnung wurde nach der Gleichung von D.L. Garbers und R.A. Johnson (67) durchgeführt.

Vergleicht man die experimentell erhaltenen Kurven der Abbildungen 18/19 ohne GMP-PNP im Inkubationsmedium mit den Modellkurven der Abb. 2o, findet man keine Überein-

stimmung. Unter den gegebenen Inkubationsbedingungen scheint die Adenylat Cyclase keine zusätzliche Mg^{++} Bindungsstellen zu besitzen.

3.4. Bindungsstudien

3.4.1. Graphisches Iterationsverfahren

Die gebräuchlichste Methode zur Charakterisierung von Bindungsstellen für Liganden ist die Darstellung der experimentellen Ergebnisse nach Scatchard (55).

$$\frac{c_g}{c_f} = K_A (N - c_g) \qquad \text{Gl. 1}$$

c_g (c_f) = Konzentration des gebundenen (freien) Liganden. K_A = Assoziationskonstante
N = Bindungskapazität

Bei nur einer Bindungsstelle (Rezeptor) ist die Auswertung sehr einfach, da die experimentellen Punkte auf einer Geraden liegen. Deren Steigung entspricht K_A und der Abszissenabschnitt ergibt die Bindungskapazität.
Wenn dagegen zwei oder mehr verschiedenartige Bindungsstellen vorhanden sind, wird die Auswertung schwieriger, da die experimentellen Punkte auf einer Kurve liegen. Zur Analyse dieser Kurven und Darstellung ihrer Einzelkomponenten werden iterative Methoden beschrieben, die nur mit Computer zu bewältigen sind (68-70). Für zwei

unabhängige Bindungsstellen gilt, daß die Gesamtbindungskurve aus zwei linearen Komponenten dargestellt werden kann (7o).
Aus Gleichung 1 erhält man nach Umformung

$$\frac{c_g}{c_f} = \sum_{n=1}^{i} \frac{N_i K_i}{1+K_i c_f} \qquad \text{Gl. 2}$$

i = Anzahl der Bindungsstellen

oder in anderer Form

$$\frac{c_g}{c_f} = \frac{z_1 + z_2 c_f}{1+z_3 c_f + z_4 c_f^2} \qquad \text{Gl. 3}$$

worin z Linearkombinationen von N und K sind.

$$z_1 = N_1K_1 + N_2K_2$$
$$z_2 = (N_1+N_2)\ K_1K_2$$
$$z_3 = K_1 + K_2$$
$$z_4 = K_1K_2 \qquad \text{(nach 7o)}$$

In Abb. 21 ist eine Gesamtbindungskurve und ihre beiden linearen Komponenten eingezeichnet. Eine Ursprungsgerade $y = x/c_f$ schneidet diese beiden Geraden und die Gesamtbindungskurve in den Punkten S_1, S_2 und P. Die Summe der Strecken $OS_1 + OS_2$ entspricht der Strekke OP (7o,73), d.h. aus den Einzelgeraden für die beiden Bindungsstellen muß die Gesamtkurve konstruiert werden können.
Diese Bedingung wird von den vereinfachenden graphischen Methoden zur Analyse einer nicht linearen Scat-

chard Darstellung nicht erfüllt (71,72).
Es wird daher ein graphisches Iterationsverfahren angewandt, das diese geometrische Beziehung als Ausgangsbedingung beinhaltet.
An die Gesamtbindungskurve, welche ein Experiment liefert, kann im Bereich geringer Ligandenkonzentrationen (Bindungsstelle mit hoher Affinität) eine Asymptote angelegt werden. Mit Hilfe dieser Asymptote und einer Ursprungsgeraden erhält man die Schnittpunkte S_1 und P. Aus der Differenz der Strecken OP - OS_1 erhält man einen Punkt S_2 auf der Asymptote im Bereich der hohen Ligandenkonzentration (Bindungsstelle mit niederer Affinität). Mit Hilfe weiterer (etwa 3) Ursprungsgeraden (auch die Abszisse oder die Ordinate zählen dazu) kann demnach die Komponente mit niederer Affinität erhalten werden.
Mit Hilfe dieser so erhaltenen neuen Geraden, kann nach dem selben Verfahren nun eine neue, genauere Gerade für die Bindungsstelle mit hoher Affinität konstruiert werden. Diese kann erneut zur Korrektur der anderen Bindungsstelle benutzt werden usw. Im Allgemeinen genügen 6 Iterationsschritte um die Gesamtbindungskurve recht genau zu analysieren.

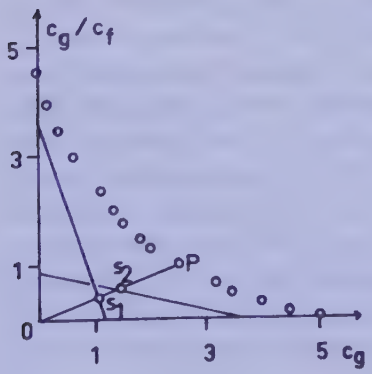


Abb. 21 Eine Gesamtbindungskurve und ihre Einzelkomponenten aus (7o).
c_g Konzentration des gebundenen,
c_f Konzentration des freien Liganden.

Aus den so erhaltenen Geraden können die Affinitätskonstanten und Bindungskapazitäten der beiden Bindungsstellen berechnet werden.
Sämtliche Scatchard Darstellungen wurden auf diese Weise analysiert. Aus den erhaltenen Konstanten K und Bindungskapazitäten N kann mit Hilfe der Gleichung 3 die Gesamtbindungskurve berechnet werden.

3.4.2. Bindung von ^{3}H-ATP an eine partikuläre Membranpräparation

3.4.2.1. Zeitabhängigkeit der ^{3}H-ATP Bindung

In Vorversuchen wurde gefunden, daß ^{3}H-ATP an eine partikuläre Membranpräparation bindet. In den folgenden Versuchen werden diese ATP Bindungsstellen teilweise charakterisiert und untersucht, ob sie in einem Zusammenhang mit der Regulation der Adenylat Cyclase Aktivität stehen.

Die Bindung von ATP an die partikuläre Präparation weist eine schnelle Phase der Sättigung auf. Innerhalb einer Minute ist die maximale Bindung erreicht (Abb. 22). Die Menge gebundenes ATP bleibt ungefähr 4 Minuten konstant, nimmt dann ab, bis nach 15 Minuten ein anscheinend gleichbleibender Wert erreicht wird. Die weitere Abnahme der Bindung ist sehr langsam und beträgt etwa 3oo - 5oo CpM/h. Die Abweichung der gebundenen Menge ATP innerhalb einer Präparation lag meistens im Bereich von $\pm$ 5 %. Die Variation von Präparation zu Präparation kann aber erheblich größer sein, ohne daß sich dadurch am Gesamtergebnis etwas ändert.

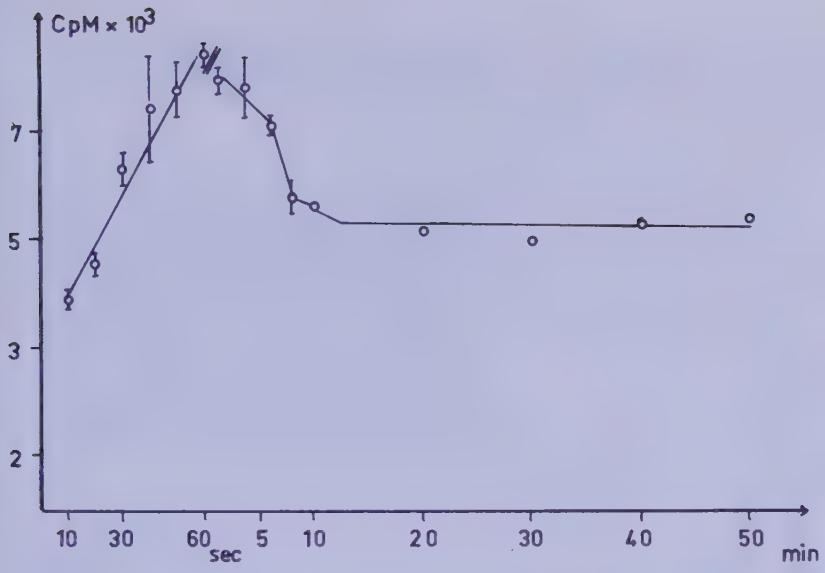


Abb. 22 Zeitabhängigkeit der ^{3}H-ATP Bindung an eine partikuläre Membranpräparation. Jede Inkubation enthielt 6o µg Protein. Die Ordinate gibt die Menge des gebundenen ATP als CpM/6o µg Protein an.

3.4.2.2. Spezifität der ATP Bindung

Die Prüfung der Spezifität der ATP Bindung erfolgte durch Verdrängen des markierten ATP durch nichtmarkiertes ATP. Ein 5 x 1o^{3}facher Überschuß an unmarkiertem ATP verhindert fast vollständig die Bindung von ^{3}H-ATP (Abb. 23).
Die unspezifische Bindung liegt zwischen 15o bis 25o CpM und stimmt überein mit der unspezifischen Bindung an hitzedenaturiertes Protein (gestrichelte Linie in der Abb. 23).

Die unspezifische Bindung von ATP ist im Vergleich zu anderen Substanzen, z.B. ^{3}H-Vasopressin oder ^{3}H-Katecholamine gering (76-78).

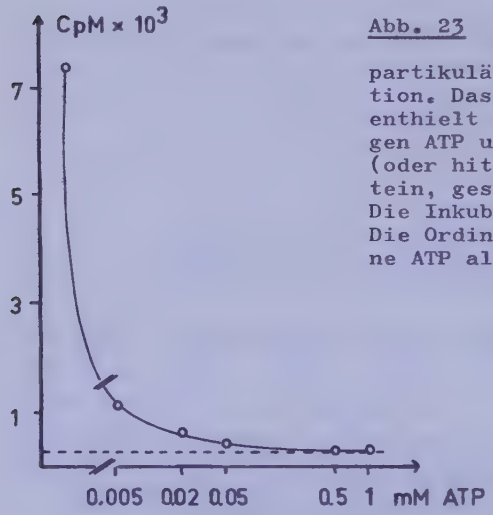


Abb. 23 Spezifität der ^{3}H-ATP Bindung an eine partikuläre Membranpräparation. Das Inkubationsmedium enthielt die angegebenen Mengen ATP und 6o µg Protein (oder hitzedenaturiertes Protein, gestrichelte Linie). Die Inkubationsdauer war 1 min. Die Ordinate gibt das gebundene ATP als CpM/6o µg Protein an.

3.4.2.3. Abhängigkeit der gebundenen Menge ATP von der Proteinkonzentration

Die ^{3}H-ATP Bindung an die partikuläre Membranpräparation verläuft linear mit zunehmender Proteinkonzentration zwischen 1o - 8o µg Protein/28o µl (Abb. 24).

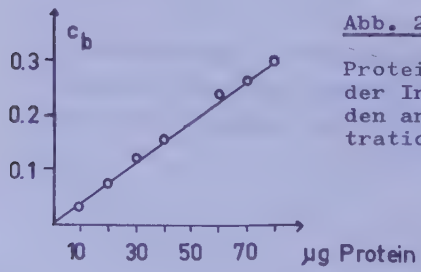


Abb. 24 Abhängigkeit der ^{3}H-ATP Bindung von der Proteinkonzentration. Die Dauer der Inkubation war 1 min mit den angegebenen Proteinkonzentrationen. c_b=pMol ATP gebunden.

3.4.2.4. Scatchard Darstellung der ^{3}H-ATP Bindung

Die Bindung von ATP an die partikuläre Präparation in der Scatchard Darstellung zeigt zwei Bindungsstellen (Abb. 25). Eine Bindungsstelle mit hoher Affinität (K_H) - geringer Bindungskapazität (N_H) und eine andere mit geringer Affinität (K_L) -hoher Bindungskapazität (N_L).
Die Bindungskonstanten sind:

$K_H = 2 \times 10^7\ M^{-1}$ $\quad N_H = 11$ pMol/mg

$K_L = 1.9 \times 10^6\ M^{-1}$ $\quad N_L = 177$ pMol/mg Protein

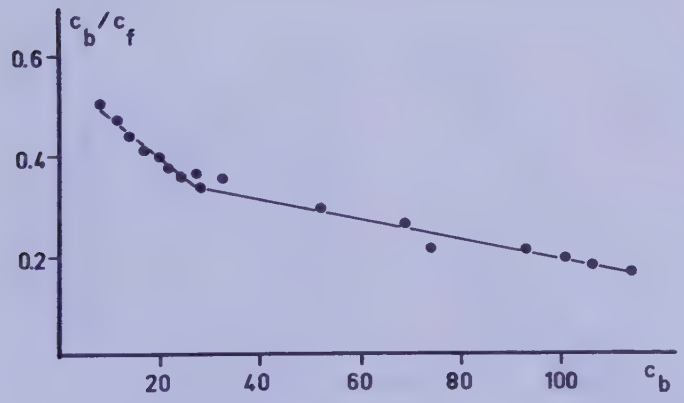


Abb. 25 Scatchard Darstellung der Bindung von ATP an die partikuläre Membranpräparation. Die Inkubationsdauer war 1 min bei 0°C mit 60 µg Protein. c_b = pMol ATP gebunden/mg Protein c_f = nM freies ATP.

3.4.2.5. Die Bindung von ATP in Gegenwart von GTP oder GMP-PNP

Da GTP und GMP-PNP die Aktivität der Adenylat Cyclase beeinflussen (s.o.), wurde die Bindung von ATP an die partikuläre Membranpräparation in Gegenwart von GTP (2o µM) oder GMP-PNP (2o und 1oo µM) untersucht.

GTP und GMP-PNP verdrängen ATP kompetitiv von seiner Bindungsstelle (Abb. 26). GTP ist wirksamer als GMP-PNP. 2o µM GMP-PNP haben nahezu keine Wirkung auf die ATP Bindung, 2o µM GTP dagegen verdrängen schon ungefähr 5o % des ATP.

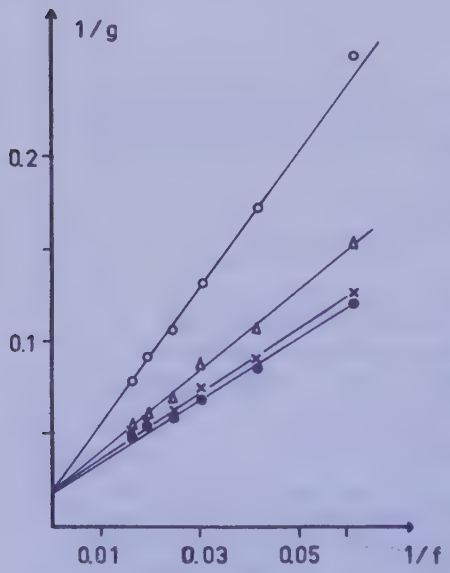


Abb. 26 Hemmung der ATP Bindung an die partikuläre Membranpräparation durch GTP (2o µM) oder durch GMP-PNP (2o und 1oo µM). Die Inkubationszeit war 1 min bei 0°C mit 6o µg Protein.
Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

●-● Kontrolle
x-x GMP-PNP 2o µM
▲-▲ GMP-PNP 1oo µM
o-o GTP 2o µM
f = nM freies ATP
g = pMol ATP gebunden/mg Protein

3.4.3. Bindungsuntersuchungen mit einer Lubrol-PX behandelten Membranpräparation

3.4.3.1. Scatchard Darstellung der ATP Bindung

Aus der Scatchard Darstellung der ATP Bindung in Abb. 27 ist zu sehen, daß ATP zwei Bindungsstellen besitzt. Die Affinitätskonstanten und Bindungskapazitäten für die Bindungsstellen mit hoher bzw. geringer Affinität betragen:

$K_H = 1.74 \times 10^7 M^{-1}$ $N_H = 2.3$ pMol/mg Protein

$K_L = 2.6 \times 10^6 M^{-1}$ $N_L = 20$ pMol/mg Protein

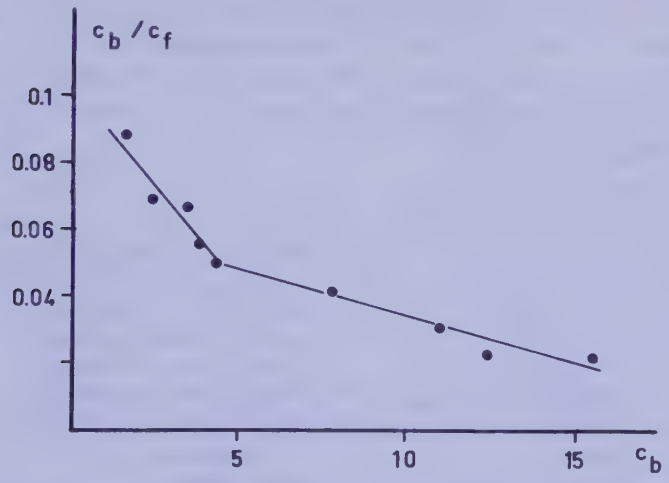


Abb. 27 Scatchard Darstellung der Bindung von ATP an eine Lubrol-PX solubilisierte Membranpräparation. Die Inkubationen wurden bei 0°C, 30 min mit 75 µg Protein durchgeführt.
c_b = pMol ATP gebunden/µg Protein c_g = nM freies ATP

Die Inkubationsdauer war 30 min, da die maximale ATP

Bindung bei der gelösten Membranpräparation erst nach dieser Zeit erreicht wird.

3.4.3.2. Bindung von ATP in Gegenwart von GMP-PNP

Bei der Lubrol-PX solubilisierten Membranpräparation erhöht GMP-PNP (2o µM) die ATP Bindung um das Doppelte.
Außerdem werden die Unterschiede der beiden Bindungsstellen für ATP durch GMP-PNP aufgehoben und es entsteht eine einzige Bindungsstelle mit der Affinitätskonstanten $K = 3 \times 1o^6/M$ und der Bindungskapazität N = 31 pMole ATP/mg Protein. (Abb. 28). Diese Bindungsstelle gleicht derjenigen mit der niederen Affinitätskonstanten.

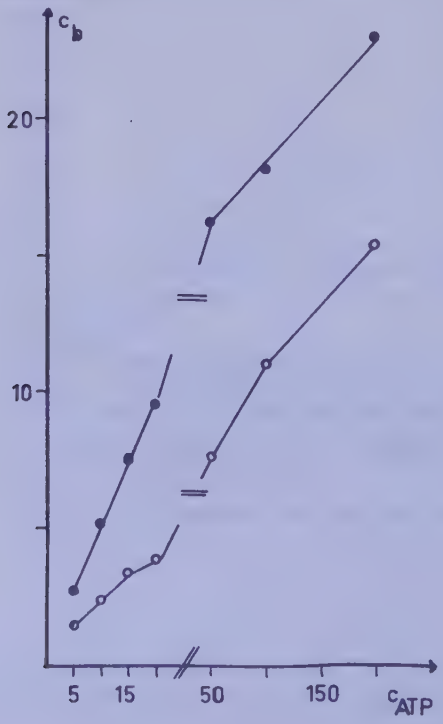


Abb. 28 Wirkung von GMP-PNP (2o µM) auf die Bindung von ^{3}H-ATP an eine solubilisierte Membranpräparation. Die Dauer der Inkubation war 3o min bei 0°C mit 75 µg Protein. Die Punkte sind Mittelwerte aus 3 - 4 Versuchen.

c_b = pMol ATP gebunden/mg Protein

c_{ATP} = pMol ATP/28o µl

o-o ATP

●-● ATP + GMP-PNP

3.4.3.3. Bindung von ^{3}H-AMP-PNP in Gegenwart von GMP-PNP

Außer ATP wird auch das ATP analoge AMP-PNP von der Adenylat Cyclase als Substrat erkannt. Es hat den Vorteil, daß es von Nukleotidasen nur langsam abgebaut wird und deshalb kein ATP regenerierendes System im Inkubationsmedium vorhanden sein muß.
Das AMP-PNP sollte sich demnach bei Bindungsuntersuchungen wie ATP verhalten.
Überraschend ist daher, daß die Bindung von ^{3}H-AMP-PNP in Gegenwart von 2o µM GMP-PNP um die Hälfte vermindert wird (Abb. 29), obwohl die Bildung von cAMP aus AMP-PNP durch GMP-PNP gesteigert wird (19,74,75).

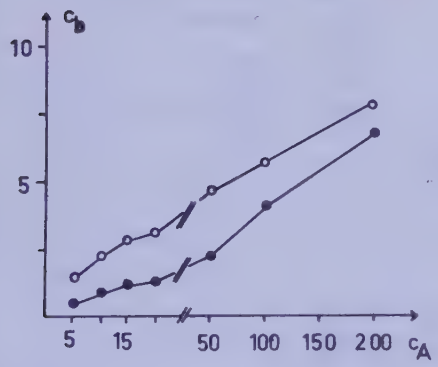


Abb. 29 Einfluß von 2o µM GMP-PNP auf die Bindung von ^{3}H-AMP-PNP an eine solubilisierte Membranpräparation. Die Dauer der Inkubation war 3o min bei 0°C mit 75 µg Protein. Die Punkte sind Mittelwerte aus 3-4 Versuchen.
c_b = pMol AMP-PNP gebunden/mg Protein
c_A = pMol AMP-PNP/28o ul
o-o AMP-PNP
●-● AMP-PNP + GMP-PNP

3.4.3.4. Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GTP, Fluorid, Calcium oder Mangan Ionen

Von den anderen untersuchten Substanzen, welche die Adenylat Cyclase aktivieren: Mn^{2+}, F^-, Ca^{2+} und GTP zeigte nur Mn^{2+} eine starke Erhöhung der gebundenen Menge ATP.

Fluorid beeinflußt die ATP Bindung kaum, GTP ohne oder mit Calcium im Medium oder Calcium alleine vermindern die gebundene Menge ATP geringfügig (Abb. 3o).

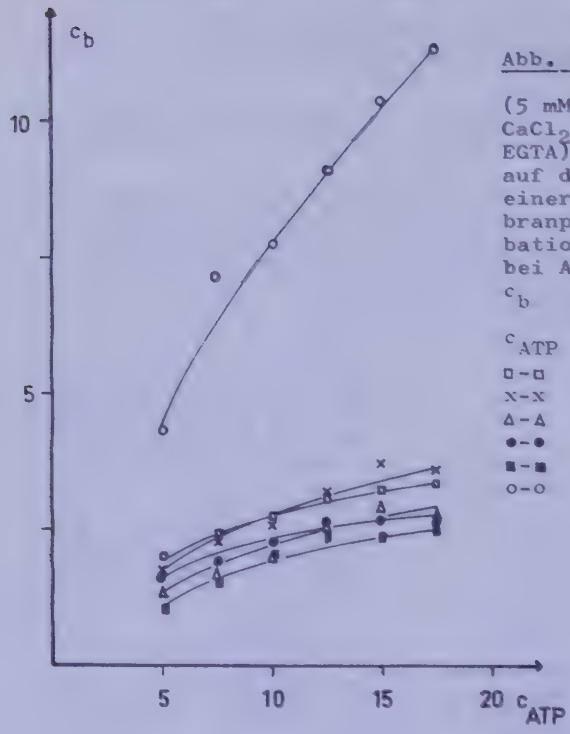


Abb. 3o Wirkungen von $MnCl_2$ (5 mM), NaF (5 mM), $CaCl_2$ (1o µM über EGTA) und GTP (2o µM) auf die ^{3}H-ATP Bindung einer gelösten Membranpräparation. Inkubationsbedingungen wie bei Abb. 29

c_b = pMol ATP gebunden/mg Protein

c_{ATP} = pMol ATP/28o µl

□-□ Kontrolle
x-x F^-
Δ-Δ GTP
●-● Ca^{++}
■-■ GTP + Ca^{++}
o-o Mn^{++}

3.4.3.5. Vergleich der Bindung der ^{3}H-markierten Nukleotide ATP, AMP-PNP und GMP-PNP

Wird die Bindung der og. Nukleotide an eine löslich gemachte Membranpräparation miteinander verglichen, so unterscheiden sich die Bindungen von ATP und AMP-PNP kaum. Auffallend ist, daß GMP-PNP sehr viel mehr Bin-

dungsstellen als die beiden anderen Nukleotide besitzt (Abb. 31).
Die Affinitätskonstanten (die Konzentrationen der Nukleotide lagen im Bereich der Bindungsstelle mit hoher Affinität) sind dagegen für alle drei Nukleotide gleich $1.7 \times 10^{7} M^{-1}$.

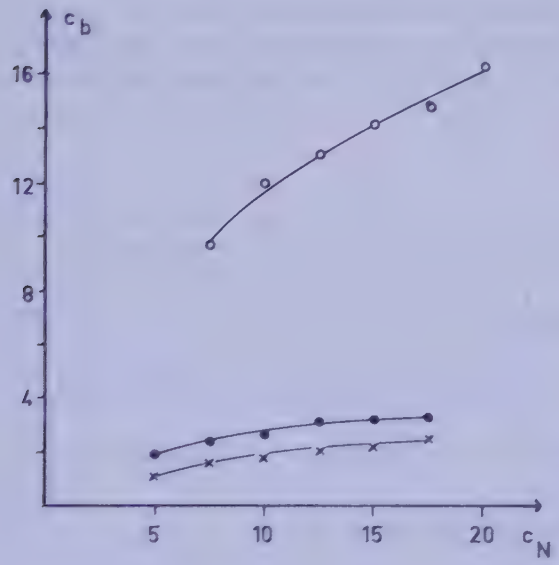
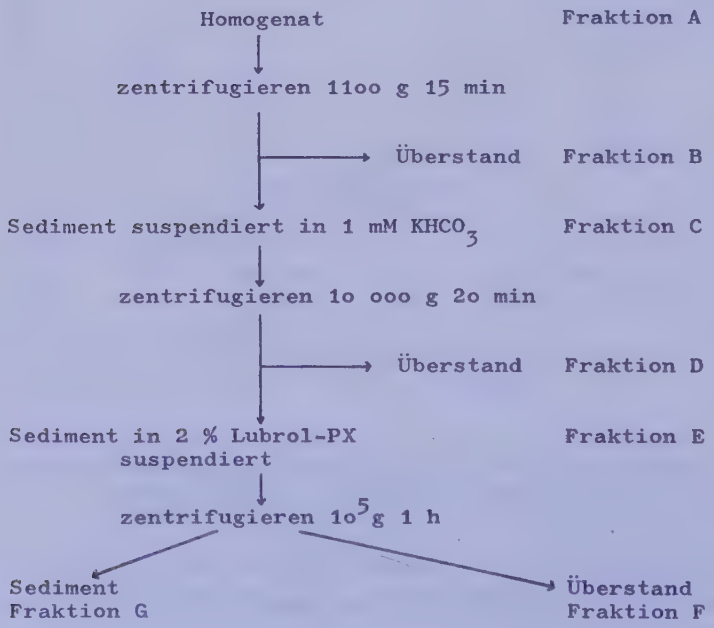


Abb. 31 Bindung der ^{3}H markierten Nukleotide ATP, AMP-PNP und GMP-PNP an eine solubilisierte Membranpräparation. Die Inkubationen wurden 30 min bei 0°C mit 75 µg Protein durchgeführt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 Versuchen.
c_b = pMol gebundenes Nukleotid/mg Protein
c_N = pMol Nukleotid/280 µl
o-o GMP-PNP •-• ATP x-x AMP-PNP

3.4.4. Untersuchung der Bindung von ^{3}H-ATP an verschiedene Fraktionen, die bei der Herstellung der löslich gemachten Membranpräparation erhalten werden

Das Ausmaß der ATP Bindung an verschiedene Fraktionen, die sich bei der Herstellung der partikulären und Lubrol-PX solubilisierten Membranpräparation ergeben, zeigt die Tab. 4. Die Bezeichnung der Fraktionen zeigt das folgende Schema. Es entspricht der in den Methoden beschriebenen Herstellung der Lubrol-PX solubilisierten Adenylat Cyclase.



Aus der Tab. 4a geht hervor, daß jede Fraktion ATP bindet, aber das Maximum der spezifischen Bindung bei der Fraktion D liegt. Waschen der Fraktion C mit hypotonem Medium bringt demnach bevorzugt das Bindungsprotein in Lösung.
Dies zeigt die Tab. 4b noch deutlicher. Bei einer neuen Präparation wurde die Fraktion C viermal mit 1 mM $KHCO_3$ gewaschen. Die Überstände nach Zentrifugation stellen die Fraktionen D_1 - D_4 dar.

Tab. 4a

Fraktion	A	B	C	D	E	F	G
CpM	1554	2242	901	1096	1601	1507	1424
mg/ml	3.5	5.60	3.5	0.88	3.5	5.24	3.5
CpM x $\frac{10^3}{mg}$	22.2	19.9	12.8	62.2	22.8	14.4	20.3

Tab. 4b

Fraktion	B	C	D_1	D_2	D_3	D_4
CpM	1115	868	5484	4487	2938	1852
mg/ml	3.0	3.0	1.59	1.36	0.95	0.74
CpM x $\frac{10^3}{mg}$	18.5	14.4	172	164	154	125

Tab. 4a,b Die nach dem obigen Schema erhaltenen Fraktionen wurden auf ^{3}H-ATP Bindung getestet. Je 20 µl der Fraktionen wurden der Inkubationsmischung zugesetzt und 1 min bei 0°C inkubiert.

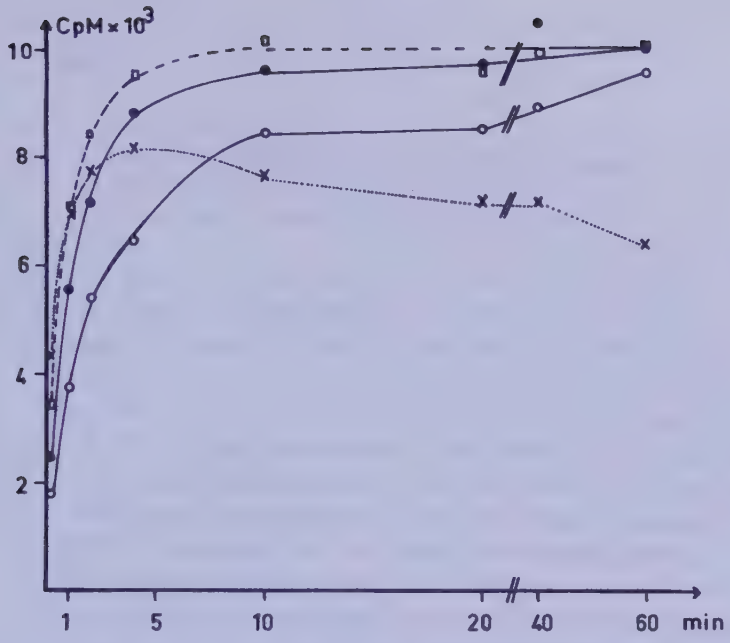
3.4.5. ^{3}H-ATP Bindung an ein Nukleotid bindendes Protein

3.4.5.1. Temperaturabhängigkeit der Bindung von ATP

Die Zeitabhängigkeit der Bindung von ^{3}H-ATP an das Nukleotid bindende Protein (siehe 3.5.) bei verschiedenen Temperaturen zeigt die Abb. 32. Die Bindung des Nukleotids verläuft mit steigender Temperatur schneller. Bei 0°C stellt sich das Gleichgewicht nach 1 h ein, bei 12°C hat es sich bereits nach 1o min Inkubation eingestellt. Die gebundene Menge ATP ist nach 1 h bei 0°C, 12°C und 25°C gleich. Die Bindung bei 37°C erreicht das Maximum nach 4 min und nimmt dann langsam ab.
Wird die Zeitachse gestreckt (Abb. 32 b), so kann man sehen, daß innerhalb einer Minute ein erster Gleichgewichtszustand erreicht wird. In diesem Fall nimmt die gebundene Menge ATP mit steigender Temperatur zu.

Zu Abb. 32a) Zeitverlauf der ^{3}H-ATP Bindung an das Nukleotid bindende Protein in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Pro Inkubation wurden 75 µg Protein eingesetzt.
o-o 0°C; •-• 12°C
□-□ 25°C; x-x 37°C

Zu Abb. 32b) Zeitverlauf der Bindung zwischen 1o und 24o sec Inkubationsdauer bei gestreckter Abszisse. Die Punkte sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen ± SEM.


CpM × 10³
10
8
6
4
2
1
5
10
20
40
60
min

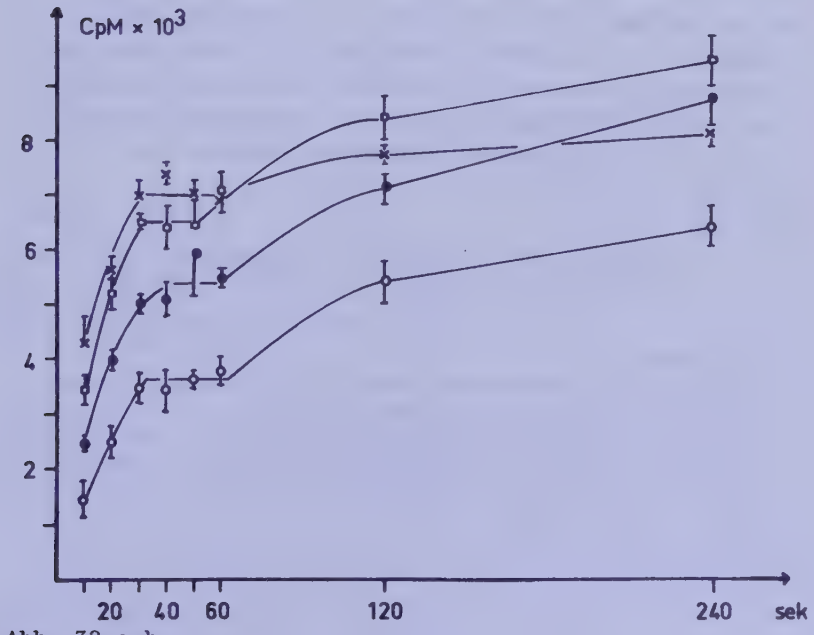

CpM × 10³
8
6
4
2
20
40
60
120
240
sek

Abb. 32 a,b

3.4.5.2. Unabhängigkeit der Affinitätskonstanten der ^{3}H-ATP Bindung von der Temperatur und der Inkubationsdauer

Die Bindung von ^{3}H-ATP an das Nukleotid bindende Protein wurde bei 0°C und 25°C, einer Inkubationsdauer von 1 min oder 1 h und variierten ATP Konzentrationen durchgeführt (Abb. 33).
Die Affinitätskonstanten sind unabhängig von der Temperatur und der Dauer der Inkubation (Tab. 5). Die sich ändernde Größe ist die Bindungskapazität, die mit längerer Inkubationszeit zunimmt. Die Kapazität der Bindungsstelle mit hoher Affinität nimmt bei 0°C stärker zu als die Kapazität der Bindungsstelle mit niederer Affinität; bei 25°C nimmt nur noch die Kapazität der Bindungsstelle mit hoher Affinität zu.
Die Einstellung des Gleichgewichts muß nicht abgewartet werden, wenn die Qualität der Wirkung einer Substanz auf die Bindungskapazität und die Affinitätskonstante untersucht werden soll. Gleichgewichtseinstellung muß nur abgewartet werden, wenn die absolute Größe der Bindungskapazität bestimmt werden soll.

Tab. 5

	$K_H \times 10^{7} M^{-1}$	$K_L \times 10^{6} M^{-1}$	N_H $\frac{pMol}{mg}$	N_L $\frac{pMol}{mg}$
0°C 1 min	2.3	3.4	21	69
0°C 1 h	2.4	4.9	68	1oo
25°C 1 min	2.9	3.1	39	98
25°C 1 h	1.4	2.o	96	94

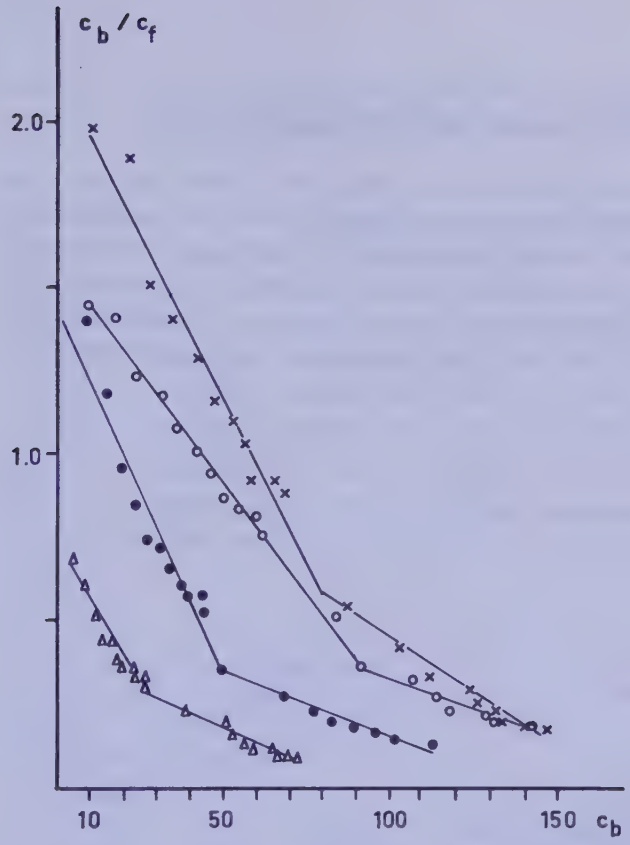


Abb. 33 Scatchard Darstellung der ^{3}H-ATP Bindung an ein Nukleotid bindendes Protein bei 0°C und 1 min (1 h) Inkubationsdauer Δ-Δ (x-x), 25°C und 1 min oder 1 h Inkubationszeit ●-●, o-o.
Jeder Testansatz enthielt 75 µg Protein.
c_b = pMol ATP gebunden pro mg Protein
c_f = nM freies ATP

zu Tab. 5 Affinitätskonstanten K und Bindungskapazitäten N für die ATP Bindung an ein Nukleotid bindendes Protein aus der Abb. 33. H (L) = Bindungsstelle mit hoher (niederer)Affinität.

3.4.5.3. Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GMP-PNP und Noradrenalin

Da GMP-PNP (o.1 mM) und Noradrenalin (o.1 mM) alleine oder zusammen die Adenylat Cyclase aktivieren, wurde geprüft, ob die beiden Substanzen die Bindung von ATP an das Nukleotid bindende Protein beeinflussen.
Die Abb. 34 zeigt, daß beide Substanzen keinen merklichen Einfluß auf die gebundene Menge ATP haben. Die Affinitätskonstanten und Bindungskapazitäten sind

$K_H = 1.6 \times 10^7 M^{-1}$ $N_H = 71$ pMol/mg Protein

$K_L = 2.6 \times 10^6 M^{-1}$ $N_L = 110$ pMol/mg Protein

Die Inkubationsdauer war 1 h bei 0°C. Diese Werte stimmen überein mit den entsprechenden der Tab. 5.

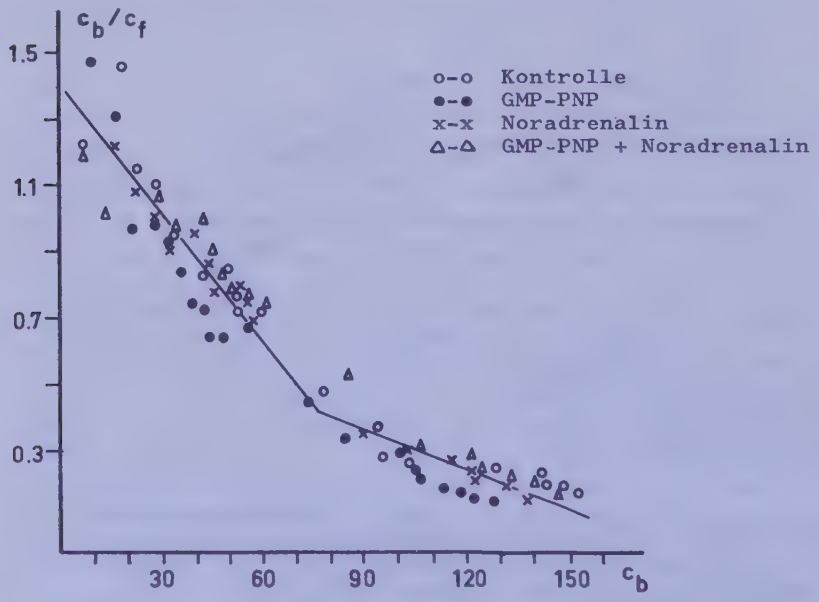


Abb. 34 Einfluß von GMP-PNP und Noradrenalin (je o.1 mM) alleine oder zusammen auf die ATP Bindung an ein Nukleotid bindendes Protein. Inkubationsdauer 1 h, 0°C mit 75 µg Protein.
c_b = pMol ATP gebunden/mg Protein c_f = µM freies ATP

3.4.5.4. Bindung von ^{3}H-ATP in Gegenwart von GTP und Adenosin

Aus der Abb. 35 ist zu sehen, daß GTP (2o µM) die ATP Bindung kompetitiv hemmt, im Gegensatz zu Adenosin (1 mM), dessen Wirkung nicht kompetitiv ist. Da nur untersucht werden sollte, ob Adenosin die Bindung von ATP beeinflußt, wurde eine unphysiologisch hohe Konzentration gewählt.

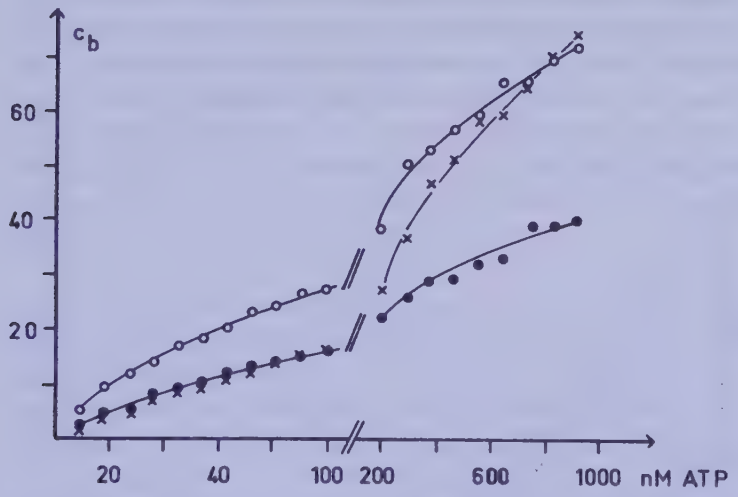


Abb. 35 Bindung von ATP an ein Nukleotid bindendes Protein in Gegenwart von 2o µM GTP oder 1 mM Adenosin. Inkubationsdauer 1 min bei 0°C mit 75 µg Protein.
o-o Kontrolle •-• Adenosin x-x GTP
c_b= pMol ATP gebunden/mg Protein

Wie die Scatchard Darstellung zeigt (Abb. 36), besetzt ATP in Gegenwart von GTP nur noch Bindungsstellen mit niederer Affinität K_L = 1.6 x $1o^{6}M^{-1}$ N_L = 12o pMol/mg Protein.

Mit Adenosin im Medium sind die beiden Bindungsstellen noch unterscheidbar. Für die Affinitätskonstanten und Bindungskapazitäten ergeben sich folgende Werte:

$K_H = 1.4 \times 10^7 M^{-1}$ $N_H = 18$ pMol/mg Protein
$K_L = 2.5 \times 10^6 M^{-1}$ $N_L = 33$ pMol/mg Protein.

Für die ATP Bindung ohne Zusatz gelten die Ergebnisse der Tab. 5, für eine Inkubationsdauer von 1 min bei 0^oC.

Die Affinitätskonstanten der Kontrolle und der Inkubation mit Adenosin im Medium unterscheiden sich nicht wesentlich. Unterschiede bestehen in den Bindungskapazitäten für die Bindungsstelle mit niederer Affinität.

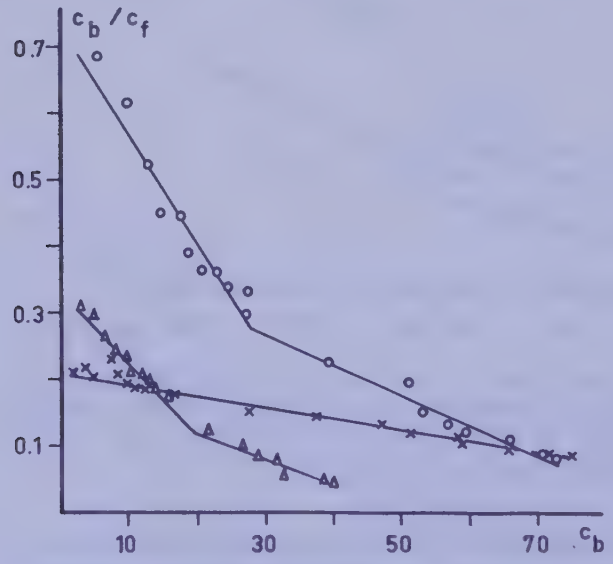


Abb. 36 Scatchard Darstellung der Bindung von ATP an ein Nukleotid bindendes Protein in Gegenwart von 2o µM GTP oder 1 mM Adenosin. Die Meßergebnisse und Inkubationsbedingungen entsprechen denen der Abb. 35.
o-o Kontrolle Δ - Δ Adenosin x-x GTP
c_b = pMol ATP gebunden/mg Protein c_f = uM freies ATP

3.5. Präparation des Nukleotid bindenden Proteins

Es soll zunächst die Darstellung einer Präparation beschrieben werden, in welcher das Nukleotid bindende Protein angereichert vorliegt.
Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet, die Gehirne entnommen und in Puffer ($0^{o}C$) gelegt (12 mM $MgCl_2$, 48 mM Tris-HCl pH 7.4, 1oo µM EGTA). Die Gehirne wurden mit dem doppelten Volumen Puffer versetzt und in einem motorgetriebenen Homogenisator mit Teflonkolben durch zwei Schläge homogenisiert.
Die feinere Zerkleinerung des Gewebes wurde in einem Dounce Homogenisator mit dem S-Kolben durch 2o Schläge durchgeführt. Dieses Homogenat wurde mit dem dreifachen Volumen des Hirngewichts 1 mM $KHCO_3$ versetzt, es wird als Fraktion A bezeichnet.

Fraktion A wurde bei 1 1oo g 15 min zentrifugiert. Der Überstand (Fraktion B) wurde nicht weiter verwendet. Dem Sediment wurden 2o ml 1 mM $KHCO_3$/15 g ursprüngliches Hirngewicht zugegeben. Nach grobem Suspendieren mit einem Glasstab wurde die Suspension durch 2 Schläge im Glas-Teflon Homogenisator noch feiner verteilt. Diese Suspension wurde bei 27 ooo g 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde noch 3 mal wie oben suspendiert und wie folgt zentrifugiert:
jeweils 48 ooo g und 4o min.
Vor der letzten Zentrifugation sollte die Suspension noch 3o min langsam gerührt werden.
Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde verworfen. Die vereinigten Überstände der 4 Zentrifugationen wurden in einer Ultrazentrifuge 1 h bei $1o^5$g zentrifugiert. Die vereinigten Überstände der Ultrazentrifuga-

tion (Fraktion C) wurden mit festem Ammoniumsulfat bis zu 7o%iger Sättigung versetzt.
Das Ammoniumsulfat wurde innerhalb 3o min zugegeben und die Lösung danach noch 3o min langsam gerührt. Der Niederschlag wurde bei 27 ooo g in 3o min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/3 Volumen des ursprünglichen Hirngewichts in Puffer gelöst (1o mM Tris-HCl pH 8.o, 1oo µM EGTA, o.1 mM NaCl, 3 mM Mercaptoäthanol).
Das nicht gelöste Sediment wurde in der Ultrazentrifuge in 8 Stunden bei 1.5 x $1o^5$g abgetrennt. Der klare Überstand ist die Fraktion D. Tab. 6.
Diese Fraktion D wurde bei allen Bindungsstudien als das Nukleotid bindende Protein verwendet.

In Vorversuchen wurde gefunden, daß diese Präparation hohe PDE und CDR Aktivität besitzt. Um festzustellen, ob das Nukleotid bindende Protein die Aktivität der Adenylat Cyclase und die Wirkung von GMP-PNP auf diese beeinflußt, sollte es zumindest so weit gereinigt sein, daß es keine PDE oder CDR Aktivität mehr aufweist.
Um das zu erreichen, wurden folgende chromatographische Methoden angewendet, die alle von der Fraktion D ausgehen.
In allen dabei anfallenden Proben wurde gemessen:

a) ATP Bindung
b) PDE Aktivität
c) CDR Aktivität.

1) Chromatographie über Sephacryl (2.5 x 1oo cm). Obwohl die Ausschlußgrenze dieses Gels bei einem Molekulargewicht von 2oo ooo Dalton liegt, wanderte das Bin-

dungsprotein im Ausschlußvolumen und konnte nicht von anderen Proteinen getrennt werden.

2) Blaue Sepharose

Der Farbstoff der blauen Sepharose, das Cibacronblau, hat große strukturelle Ähnlichkeit mit NAD und ATP. Da verschiedene Dehydrogenasen und auch die Adenylat Cyclase teilweise darüber gereinigt wurden, könnte auch das Nukleotid bindende Protein eine Affinität zu dem Farbstoff aufweisen und auf diese Weise gereinigt werden.
Das in 1 mM $KHCO_3$, 1oo µM EGTA und 3 mM Mercaptoäthanol gelöste Bindungsprotein wurde aber von der Säule (o.5 x 2o cm) nicht gebunden. Nachfolgende Elution mit 1 m NaCl im selben Puffer löste keine Nukleotid Bindungsaktivität von der Säule ab.

3) ATP-Sepharose 4B

Nach der Vorschrift der Firma Pharmacia wurde ATP an aktivierte Sepharose 4B gebunden.
Das fertige Gel wurde in Puffer 1 (1o mM Tris-HCl pH 7.4, 1o mM $MgCl_2$, 3 mM Mercaptoäthanol) suspendiert. Die Säule wurde so lange mit Puffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluats bei 26o nm < o.o6 war. Danach wurden 13 mg der Fraktion D aufgetragen und mit obigem Puffer eluiert. Gleich nach Anschluß des Puffers erschienen zwei Proteingipfel. Nach Rückkehr der Transmission auf 1oo % wurde mit Puffer 2 (1o mM Tris-HCl pH 7.4, o.5 M NaCl, 2o mM EGTA und 3 mM Mercaptoäthanol) eluiert. Kurz nach Anschluß dieses Puffers erschien ein weiterer kleiner Proteingipfel.
Die Prüfung der Fraktionen auf ATP Bindung, CDR und PDE Aktivität zeigte, daß alle drei Aktivitäten mit

dem Puffer 1 eluiert werden. Nach Anschluß des Puffers 2 wird weitere Bindungs- und PDE Aktivität eluiert. Der größte Teil der Bindungsaktivität konnte allerdings von der Säule nicht zurückgehalten werden und wurde mit dem Puffer 1 eluiert. Die Kapazität der Säule scheint demnach recht gering zu sein und sich nicht zur Reinigung größerer Mengen des Bindungsproteins zu eignen.

4) Sephadex G-2oo und Sepharose 6B
Auf eine Sephadex G-2oo Säule (5 x 1oo cm), die mit 1o mM Tris-HCl pH 8.o 1oo µM EGTA, o.1 M NaCl und 3 mM Mercaptoäthanol äquilibriert war, wurden bis zu 2oo mg Protein aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 5 ml/h, die Fraktionsgröße war 5 ml. Die Fraktionen zeigen 3 Gipfel mit PDE Aktivität (wie bei der Herstellung der CDR freien CDR abhängigen PDE), zwei Gipfel mit ATP Bindung und einen Gipfel mit CDR Aktivität (Abb. 37). Der erste PDE Gipfel erscheint immer wenige Fraktionen vor dem ersten Gipfel mit Bindungsaktivität. Der zweite und dritte Gipfel mit PDE Aktivität und das CDR Protein werden vollständig vom Bindungsprotein getrennt.
Der zweite Gipfel mit Bindungsaktivität war immer zu sehen, wurde aber nicht weiter untersucht. Die Fraktionen des ersten Gipfels mit Bindungsaktivität wurden vereinigt, in einen Dialysierschlauch gefüllt und mit dialysiertem, dann lyophilisiertem Polyäthylenglykol eingeengt. (Fraktion G). Die Fraktion G wurde über eine Sepharose 6B-Säule (2.5 x 1oo cm) im selben Puffer chromatographiert. Durchflußgeschwindigkeit und Fraktionsgröße wie oben. Die verbliebene PDE Aktivität konnte auch hier nicht völlig von dem Bindungsprotein getrennt werden. Die vereinigten, ATP bindenden Fraktionen wurden mit Polyäthylenglykol eingeengt (Fraktion H) und zur

Entsalzung über eine mit 1 mM $KHCO_3$ äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (1 x 5o cm) chromatrographiert.

Fraktion	Gesamtvolumen ml	Protein mg/ml	Gesamtprotein mg	$\frac{CpM \times 10^3}{mg\ Protein}$	Gesamt CpM $x10^6$
A	315	17.5o	5512.o	79	43o.oo
B	236	5.58	1316.o	227	29o.oo
C	43o	1.35	58o.o	28o	16o.oo
D	21	7.96	176.o	414	69.1o
G	11	2.71	29.8	177	5.3o
H	3	1.oo	3.o	118	o.35

Tab. 6 Anreicherung der ATP Bindungsaktivität bei verschiedenen Reinigungsschritten (siehe Text). Je 2 - 8 µl der Fraktionen A-H wurden 1 h bei O°C wie in Methoden beschrieben inkubiert.

Aus der Tab. 6 wird deutlich, daß die spezifische Bindung von ATP bei der Fraktion D ein Maximum erreicht und danach mit jedem Reinigungsschritt abnimmt. Das Bindungsprotein kann unter den angewandten Bedingungen nicht eingefroren werden, da die Lagerung bei -8o°C über Nacht die Bindungsaktivität um 6o % vermindert.
Beim Test auf ATP Bindung wurde darauf geachtet, daß alle Fraktionen mit der gleichen Menge des Puffers, in dem der Ammoniumsulfatniederschlag gelöst wurde, versetzt wurden. Auf diese Weise war die Ionenstärke in den Inkubationen ungefähr gleich und die unterschiedliche Bindung ist nicht auf deren Einfluß zurückzuführen.

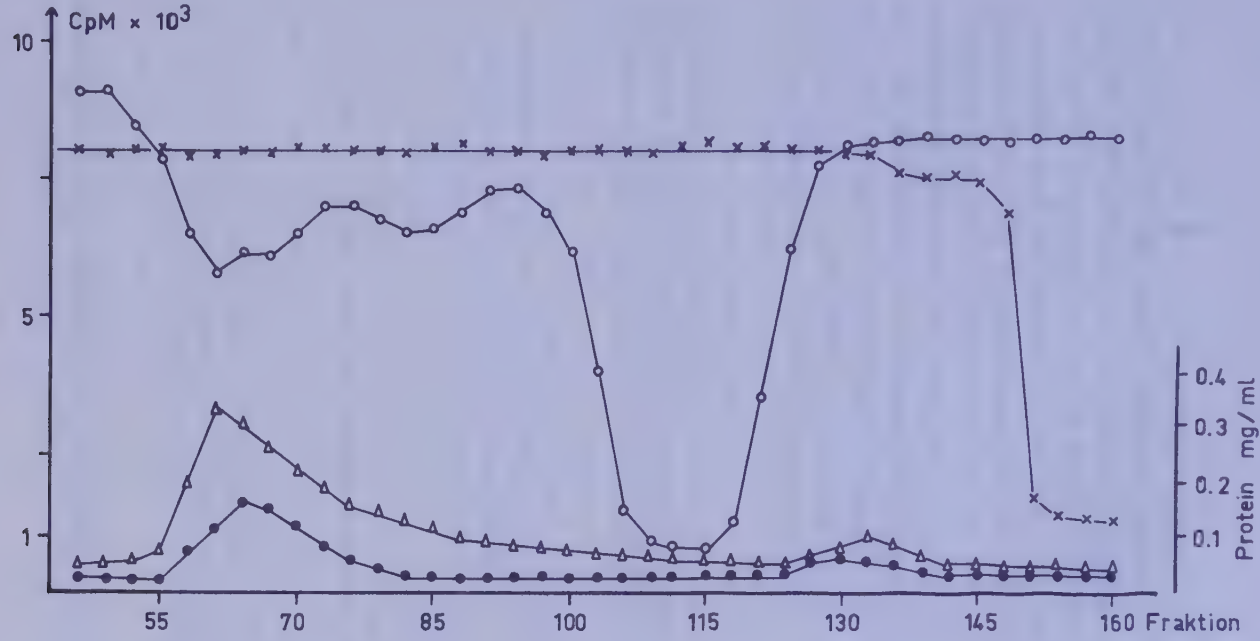


Abb. 37 Sephadex G-2oo Gelchromatrographie der Fraktion D (siehe Text). Bis zu 2oo mg Protein der Fraktion D wurden auf eine mit Puffer äquilibrierte Säule (5 x 1oo cm) aufgetragen. Durchflußgeschwindigkeit 5 ml/h, Fraktionsgröße 5 ml. Die Fraktionen wurden wie in Methoden beschrieben auf ATP Bindung (●-●), PDE (o-o) und CDR (x-x) Aktivität getestet. Bei der Bestimmung der PDE und CDR Aktivität wurde die Menge nicht hydrolysiertes ^{3}H-cAMP aufgetragen, d.h. einem Tal entspricht eine hohe Aktivität. Protein Δ-Δ

Um die Vergleichbarkeit der ATP Bindung an die verschiedenen Fraktionen abzusichern, wurde immer die Abhängigkeit der Bindung von der Proteinkonzentration gemessen. Zur Berechnung der spezifischen Bindung wurden solche Werte benutzt, die im linearen Bereich lagern.

3.6. Beeinflußt das Nukleotid bindende Protein die Adenylat Cyclase Aktivität?

Eine mit Lubrol-PX solubilisierte Adenylat Cyclase wurde wie beschrieben hergestellt, mit der Änderung, daß im Homogenisationsmedium ATP (2 mM) vorhanden war und das Sediment nach der Zentrifugation mehrmals mit 1 mM $KHCO_3$ gewaschen wurde, um möglichst viel des Nukleotid bindenden Proteins herauszulösen.
Diese Präparation wurde einmal mit steigenden Konzentrationen GMP-PNP (2 nM - o.2 mM) auf die Stimulierbarkeit untersucht, einer zweiten Testreihe wurden 2o µg des Nukleotid bindenden Proteins (nach Reinigung durch Sephadex G-2oo und Sepharose 6B Chromatrographie) zugegeben und ebenfalls auf GMP-PNP Stimulierbarkeit untersucht. Das Ergebnis zeigt die Abb. 38. Durch GMP-PNP (ohne Zusatz des Nukleotid bindenden Proteins) wird die Aktivität der löslich gemachten Adenylat Cyclase zunächst etwas verringert, aber zwischen 2oo nM und 2 µM GMP-PNP stark gesteigert. Die Aktivitätssteigerung flacht dann zwischen 2o und 2oo µM GMP-PNP ab.
Der Zusatz von Nukleotid bindenden Protein zur Inkubation vermindert geringfügig die basale Aktivität. Die Aktivitätssteigerung durch GMP-PNP verläuft nahezu parallel der Kurve ohne Zusatz von Nukleotid bin-

dendem Protein. Das heißt, mit einer Adenylat Cyclase Präparation, die noch durch GMP-PNP stimulierbar ist, kann nicht gezeigt werden, ob das Nukleotid bindende Protein den die Adenylat Cyclase Aktivität regulierenden Faktor darstellt.

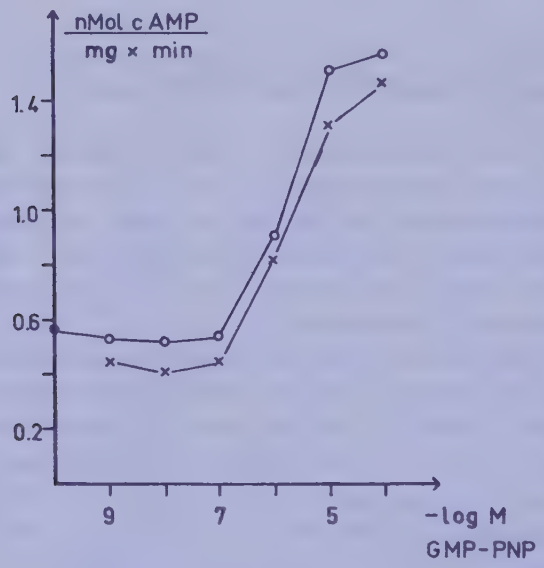


Abb. 38 Inkubation von 6o µg einer Adenylat Cyclase Präparation (siehe Text) mit GMP-PNP (2 nM - 2oo µM) ohne oder mit Zusatz von 2o µg einer Präparation des Nukleotid bindenden Proteins. Inkubationsbedingungen siehe Methoden.

4. Diskussion

4.1. Phosphodiesterasen

Die vielen Untersuchungen, welche die Reinigung und die Aufklärung der Regulation der Aktivität von Phosphodiesterasen zum Ziel haben, zeigen ein zunehmend komplizierteres Bild.
Bei der Reinigung der Phosphodiesterasen wurden meist drei, aber auch mehr verschiedene PDE Aktivitäten gefunden, von denen einige sowohl cAMP als auch cGMP als Substrat annehmen (93,1oo,1o1). Die Hydrolyse des cAMP kann durch cGMP stimuliert werden (94,95).
A.L. Pichard und W.Y. Cheung (93) konnten durch Dichtegradientenzentrifugation drei PDE Aktivitäten voneinander trennen. Wird jede dieser drei Phosphodiesterasen einzeln erneut über einen Dichtegradienten zentrifugiert, so werden wieder dieselben drei PDE Aktivitäten erhalten. Es scheint demnach, daß zumindest drei PDE Formen durch Änderung der Proteinkonzentration ineinander überführbar sind. Zwei der drei Phosphodiesterasen besitzen mit 22 ooo bzw. 75 ooo Dalton ein relativ geringes Molekulargewicht im Vergleich zu dem meist gefundenen von 14o ooo Dalton.

Die in Zellkulturen oder Gehirnschnitten gemessenen cAMP Konzentrationen können durch Neurohormone erhöht werden. Diese Erhöhung wird verstärkt, wenn (vermutliche) PDE Hemmer dem Inkubationsmedium zugegeben werden. Deren Wirkung ist aber wiederum abhängig von dem verwendeten Neurohormon (53,54,98).

Von mehreren Psychopharmaka wurde gefunden, daß sie die

PDE Aktivität in Gehirnhomogenaten vermindern (96,1o5). Es wurde versucht, die PDE hemmende Eigenschaft und damit die Erhöhung der cAMP Konzentration im Gehirn mit der psychischen Wirkung der Substanzen zu verbinden (96). Es ist jedoch möglich, die Zunahme der cAMP Konzentration im Gehirn - verursacht durch PDE hemmende Psychopharmaka - zu verhindern (durch Theophyllin) aber dennoch die Verhaltensweise der Tiere, die durch die Substanz verursacht wird, zu beobachten (97). Umgekehrt kann auch die cAMP Konzentration z.B. durch Haloperidol erhöht werden, ohne daß es die PDE Aktivität in einem Hirnhomogenat beeinflußt (97).

Wie oben erwähnt, kann Theophyllin die Wirkung von einigen PDE hemmenden Psychopharmaka auf die cAMP Konzentration verhindern. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Substanzen die cAMP Konzentration im Gehirn gar nicht unmittelbar über eine Hemmung der PDE Aktivität, sondern indirekt über Adenosin erhöhen. Es ist bekannt, daß Theophyllin in Zellkulturen oder in Gehirnschnitten die Wirkung von Adenosin hemmt (97,1o7,1o8).

Der einzige bisher gefundene Regulationsmechanismus von Bedeutung, d.h. bei dem die Aktivität zumindest einer Form der Phosphodiesterasen innerhalb weiter Grenzen schwankt, ist die Regulation der CDR abhängigen PDE durch Calcium und das CDR Protein (31,32). Die wirksame, die PDE aktivierende Form des CDR Proteins ist der Komplex $Ca_3^{++}Mg^{++}CDR$ (99).

Da Adenosin die Permeabilität von Calciumionen durch die Zellmembran vermindert (1o9-111), könnte ein dadurch bewirkter Mangel an freiem Calcium in der Zelle

eine verminderte Aktivität der CDR abhängigen PDE verursachen und für die erhöhte cAMP Konzentration verantwortlich sein.
So gesehen, sollte es in physiologischen Konzentrationen die zellfreie PDE nicht hemmen (siehe 3.1.2.), da dieser Wirkungsmechanismus eine funktionsfähige Zellmembran erfordert.
Eine Hemmung der PDE Aktivität im zellfreien System muß demnach nicht dem Wirkungsmechanismus der Substanz im unversehrten Gewebe entsprechen.
Außerdem ist die Wirksamkeit eines PDE Hemmers abhängig von der Art der PDE Präparation und von der Substratkonzentration.
Zudem wäre es möglich, daß neben einer Hemmung der PDE Aktivität eine Aktivierung der Adenylat Cyclase verursacht wird (siehe 4.2.1.).

Solange es also nicht gelingt, die Phosphodiesterasen in gereinigter Form zu erhalten und zu charakterisieren, dürfte es nur in Einzelfällen möglich sein, von der Regulation der Aktivität verschiedener PDE Präparationen im zellfreien System auf deren Bedeutung im intakten Gewebe zu schließen.
Es kommt noch hinzu, daß bisher keine Klarheit darüber besteht, welche PDE Formen hauptsächlich frei, d.h. im Cytoplasma und welche an die Zellmembran gebunden sind.

4.2. Adenylat Cyclase

Die Aktivität der Adenylat Cyclase kann durch eine Vielzahl von Effektoren beeinflußt werden. Soweit möglich, werden die verschiedenen Effektoren getrennt diskutiert. Überschneidungen lassen sich aber nicht immer vermeiden, so daß manchmal auf schon Gesagtes zurückgegriffen werden muß.

4.2.1. Beeinflussen Hemmstoffe der Phosphodiesterasen die Adenylat Cyclase Aktivität

In allen zellfreien Adenylat Cyclase Systemen müssen PDE Hemmer vorhanden sein, da die Präparationen bemerkbare PDE Aktivität besitzen. Es mußte daher eine Proteinkonzentration gefunden werden, die noch meßbare (im Bereich des Gilman-Tests liegende) cAMP Mengen bildet, ohne aber störende PDE Aktivität zu zeigen.
Dies ist eine Voraussetzung zur experimentellen Kontrolle der Annahme, daß die Adenylat Cyclase durch PDE Hemmer aktiviert wird. Werden Gehirnschnitte mit Hormonen und verschiedenen Hemmstoffen der PDE inkubiert, ergeben sich unterschiedliche steady state Konzentrationen an cAMP. Wird den Inkubationen nach Erreichen des steady state Zustandes ^{3}H-Adenin zugegeben, so ist die Einbaurate von ^{3}H-Adenin in ^{3}H-cAMP direkt proportional der cAMP Konzentration (28,9o).
Eine Stimulierung der Adenylat Cyclase Aktivität in Hirnhomogenaten konnte unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden.
Dadurch, daß die Aktivität der Adenylat Cyclase ohne und mit Calcium im Medium in Gegenwart von Hemmstoffen der PDE nicht wesentlich beeinflußt wird, ist auch gezeigt, daß wahrscheinlich die PDE Hemmung (unmittelbar oder

mittelbar) im Vordergrund der Wirksamkeit dieser Substanzen in Gehirnschnitten steht.

4.2.2. Wirkung von Calciumionen auf die Adenylat Cyclase Aktivität unter verschiedenen Bedingungen

Die stimulierende Wirkung geringer Ca^{++} Konzentrationen auf die basale Aktivität der Adenylat Cyclase steht in Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen (17), ebenso die starke Hemmung durch hohe Calcium Konzentrationen (3o).
Bei der Untersuchung von anderen Effektoren z.B. GTP wurde aber der Einfluß von Calcium nur unzureichend untersucht.
So gibt es widersprüchliche Ergebnisse für die GTP Wirkung auf die Adenylat Cyclase aus Leberzellmembranen. Die basale Aktivität wird durch GTP nicht beeinflußt (82), nach (63,83-85) wird sie erhöht. In Schilddrüsenmembranen erhöht es die basale Aktivität (25) an Truthahn- und Froscherythrozyten hat es keine Wirkung (21,64). In Fettzellen vermindert GTP die Aktivität der Adenylat Cyclase (27,64), in Blutplättchen und Kaninchenherzmuskel wird sie gesteigert.
Die durch GTP hervorgerufenen Änderungen der Aktivität liegen dabei zwischen 1o-1oo %.
Es wurde gezeigt, daß GTP in Abhängigkeit von Ca^{++} sowohl hemmen als auch aktivieren kann. Einige der hier geschilderten Diskrepanzen könnten eine Folge der nicht genau kontrollierten Ca^{++} Konzentrationen sein.

Die Adenylat Cyclase der partikulären Membranpräparation zeigt eine geringere Abhängigkeit ihrer Aktivität von Calciumionen als die Lubrol-PX solubilisierte Präparation. Es ist wahrscheinlich, daß in den Vesikeln der partikulären Präparation noch so viel Calciumionen enthalten sind, daß sich die zusätzlichen 1o µM nicht so stark auswirken, wie bei der gelösten Adenylat Cyclase.

Dadurch, daß Ca^{++} vermutlich nur intrazellulär wirksam werden kann (29, intakte Blutzellen), und alle anderen Effektoren fast wirkungslos werden, kann man annehmen, daß es direkt an der Adenylat Cyclase angreift (29,3o).
Eine andere Möglichkeit besteht in der Wirkung des Ca^{++} über das CDR Protein. Wie von Brostrom et al. gefunden wurde (79-81), kann das CDR Protein in Gegenwart von Ca^{++} die Adenylat Cyclase aktivieren. Ob dieser Wirkung im zellfreien System auch physiologische Bedeutung zukommt, bleibt zweifelhaft, da die CDR abhängige PDE schon durch etwa $1o^3$fach weniger CDR Protein aktiviert wird als die Adenylat Cyclase.

4.2.3. Adenosin

Für die Adenosin Wirkung an unbeschädigten Zellen wird ein an der äußeren Zellmembran befindlicher Rezeptor postuliert, d.h. die Wirkung von Adenosin ist normalerweise extrazellulär, vielleicht durch Hemmung des Ca^{++} Einstroms in die Zelle (s.o.).
Es stimuliert in Gehirnschnitten, allein oder zusammen

mit Neurotransmittern synergistisch die cAMP Bildung (42,56,86).
Eine Stimulation der Adenylat Cyclase Aktivität im Hirnhomogenat durch Adenosin (58,87,88) konnte nicht festgestellt werden, sondern es wurde reproduzierbar eine Hemmung der cAMP Bildung gefunden, die schon bei einer Konzentration von 1oo nM Adenosin bemerkbar war. Wenn Adenosin schon bei dieser geringen Konzentration die basale Aktivität beeinflußt, so muß am Adenylat Cyclase System eine Stelle angenommen werden, die zu Adenosin eine hohe Affinität besitzt. Ob sich diese Stelle an der katalytischen Einheit befindet, kann nicht gesagt werden. Die Hemmung könnte auch über das Nukleotid bindende Protein durch Verdrängen des ATP von seiner Bindungsstelle bewirkt werden, wie es bei der gelösten Präparation gezeigt wurde.

4.2.4. Histamin

In Gehirnschnitten kann die cAMP Bildung in normalem calciumhaltigen Medium durch Histamin nur einmal stimuliert werden. Diese Schnitte bleiben auch nach dem Waschen mit Puffer unempfindlich gegen erneuten Zusatz von Histamin. Da im Ca^{++} freien Medium eine Restimulierung mit Histamin möglich ist (1o6), wurde die Unempfindlichkeit in Ca^{++}haltigem Medium durch eine gesteigerte PDE Aktivität als Folge einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration erklärt. (39,6o). Eine andere Erklärung dafür ist, daß die Histaminrezeptoren unempfindlich werden.

Die Vorinkubation der Membranfragmente mit ATP sollte Hinweise darauf geben, ob die Unempfindlichkeit des Adenylat Cyclase Systems durch Phosphorylierung bestimmter Proteine verursacht wird, wie von V.A. Najjar und A. Constantopoulos vermutet wurde (113). Da unter ähnlichen Bedingungen eine Phosphorylierung von Proteinen aus synaptischen Vesikeln gefunden wurde (114), sollte sie auch hier möglich sein.
Eine Unempfindlichkeit der Adenylat Cyclase nach Histaminstimulierung gegen erneute Stimulierung mit Histamin konnte aber bei der partikulären Präparation nicht gezeigt werden. Die Stimulation der Adenylat Cyclase Aktivität durch Histamin wird als Folge der Vorbehandlung sogar um 15-2o % gesteigert.

Wie das elektronenmikroskopische Bild zeigt, handelt es sich bei der partikulären Membranpräparation um angereicherte Synaptosomen. Von Noradrenalin ist bekannt, daß es in den synaptischen Vesikeln gespeichert wird. Die Konzentration von Noradrenalin in dieser Membranpräparation liegt bei etwa 5 µg/mg Protein, was etwa 4o µM entspricht.
Die größere Stimulierung durch Histamin nach Vorinkubation kann dadurch erfolgen, daß endogenes Histamin durch die sich an die Vorinkubation anschließende Behandlung herausgewaschen wurde.
Unterstützt wird diese Annahme durch den experimentellen Befund, daß die basale Aktivität der Adenylat Cyclase durch Histamin Antagonisten vermindert wird.

4.3. Nukleotid bindendes Protein

Von der Überlegung und vorliegenden Untersuchungen ausgehend (1o2), daß ein Substrat auch bei Temperaturen um $0^{o}C$ oder in nicht wässrigem Medium unter $0^{o}C$ an das Enzym bindet, sollte eine andere Möglichkeit zur Charakterisierung der Adenylat Cyclase versucht werden. Statt die Substrat Bindungsstellen über kinetische Untersuchungen durch Messung des gebildeten cAMP zu charakterisieren, sollte dies auch direkt durch Messung der Bindung des Substrats an die katalytische Stelle möglich sein. Die Bedingungen sollten so gewählt werden, daß die Produktbildung vernachlässigt werden kann.
Die aus kinetischen Versuchen und Bindungsstudien erhaltenen Werte für die Affinitätskonstanten unterscheiden sich jedoch um das $1o^{3}$fache, so daß es sich bei den Nukleotid Bindungsstellen nicht um die Substratbindungsstellen handeln kann.

Im Zusammenhang mit dem von M. Rodbell (1o4) gefundenen Effekt von GTP auf die Hormon stimulierbare Adenylat Cyclase wurden Bindungsstudien mit ^{3}H-GMP-PNP bzw. ^{3}H-GMP-PCP an Vogelerythrozyten Membranen durchgeführt (21,23). Diese binden das Nukleotid an zwei verschiedene Bindungsstellen. Diesem Nukleotid bindenden Protein wird die Rolle des die Adenylat Cyclase Aktivität regulierenden Faktors zugeschrieben.
Die Bindung von ^{3}H-ATP an die partikuläre, die Lubrol-PX solubilisierte Adenylat Cyclase und an eine angereicherte Präparation eines Proteins weist in allen drei Fällen zwei Bindungsstellen und übereinstimmende Affinitätskonstanten auf, so daß es sich möglicherweise immer um dasselbe Protein handelt.

Die Affinitätskonstanten stimmen im Wesentlichen mit den berichteten überein (21,23).

Auffallend ist, daß von den beiden Ionen, Mn^{++} und F^-, die die Adenylat Cyclase Aktivität stark erhöhen, Mn^{++}, wie GMP-PNP, die Bindungskapazität der gelösten Adenylat Cyclase für ATP steigert. F^- (5 mM) beeinflußt die ATP Bindung kaum, obwohl bei dieser Konzentration die Aktivität der Adenylat Cyclase durch F^- noch stärker als durch Mn^{++} (5 mM) erhöht wird. Das läßt vermuten, daß Mn^{++} oder $MnATP^{--}$ nicht unmittelbar auf die katalytische Einheit, sondern über das Nukleotid bindende Protein wirken.

Es wird vermutet, daß das Nukleotid bindende Protein aus mehreren Untereinheiten besteht. (23).
Das Auftreten zweier Gipfel mit ATP Bindungsaktivität bei der Sephadex G-2oo Gelchromatographie könnte für den Aufbau des Bindungsproteins aus mehreren Untereinheiten sprechen.
Eine vollständige Reinigung ist auf Grund der Instabilität des Proteins bisher noch nicht gelungen. Legt man den Proteingehalt des Ausgangshomogenats (A) und den der Fraktion H zu Grunde, so beträgt die Anreicherung etwa das $1o^3$fache.

Zur Kontrolle, ob das Nukleotid bindende Protein wirklich den die Adenylat Cyclase Aktivität regulierenden Faktor darstellt, sollte eine Adenylat Cyclase zur Verfügung stehen, die nicht mehr durch GMP-PNP stimulierbar ist. Durch Zusammengeben einer solchen Adenylat Cyclase mit dem Bindungsprotein sollte die GMP-PNP Stimulierbarbarkeit wieder hergestellt werden.

Da bisher alle Adenylat Cyclase Präparationen durch GMP-PNP noch stimulierbar waren, konnte dieser direkte Beweis noch nicht durchgeführt werden.
Vor kurzem wurde von T. Pfeuffer (112) die Rekonstitution einer GMP-PNP unempfindlichen Adenylat Cyclase aus Tauben Erythrozyten mit einem Nukleotid bindenden Protein (ebenfalls aus Tauben Erythrozyten) berichtet. Durch dieses Nukleotid bindende Protein wurde die Stimulierbarkeit der Adenylat Cyclase durch GMP-PNP wiederhergestellt.

4.4. Modell zur Regulation der Adenylat Cyclase Aktivität

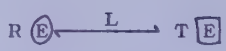
Da keines der kinetischen Modelle (62,67,75) das unterschiedliche Verhalten der Adenylat Cyclase unter verschiedenen Bedingungen, lineare Michaelis-Menten Kinetik oder gekrümmte Kurven, erklären kann, wird ein Modell vorgeschlagen, welches aus einer Komponente besteht, die Michaelis-Menten Verhalten zeigt, und einer anderen Komponente, die allosterische Eigenschaftn besitzt.

Folgende Annahmen werden gemacht:
Die allosterische Komponente existiert in zwei Zuständen, die ineinander übergehen können.

$$R \longleftrightarrow T$$

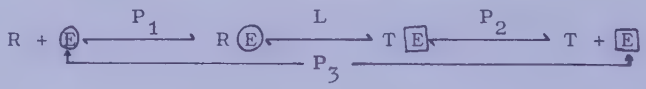
Dabei stellt R die enzymatisch aktive, T die inaktive Form dar. Die R und T Formen sind mit einem Protein verbunden, welches Effektoren bindet und ebenfalls in zwei

Zuständen existiert.



L ist das Verhältnis der inaktiven zu der aktiven Form.
$L = T\,[E] \,/\, R\,(E)$.
Die Komplexe R (E) und T [E] können dissoziieren. Nur die R-Form der katalytischen Komponente bindet Substrat, ebenfalls kann nur die (E)-Form des Effektorproteins den Effektor binden. Die Umwandlung der katalytisch inaktiven zur aktiven Form soll nur möglich sein, wenn sie mit dem Effektorprotein assoziiert ist, d.h. die direkte Umwandlung T↔R soll nicht möglich sein. Dagegen soll die Umwandlung (E)↔[E] ohne R, T erfolgen können.

Es soll daher folgende Gleichung gelten:



Die Dissoziation der einzelnen Komplexe (R (E) , T [E]) ist durch äußere Faktoren beeinflußbar. Für die Verhältnisse P_1, P_2 und P_3 gilt daher folgende Beziehung:

$$P_1 = \frac{P_2}{P_3} \cdot \frac{R}{T} \times L$$

(Ableitung siehe unten)

Wird das vorgeschlagene Modell in Form einer Gleichung dargestellt, so muß auch diese aus zwei Teilen bestehen. Der erste beschreibt das Verhalten eines Enzyms nach Michaelis-Menten, der zweite die Kinetik eines allosterischen Enzyms, bei dem der Effektor und das Substrat nur

an die aktive Form binden (1o3).

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\beta_1 \alpha}{1+\alpha} + \frac{\beta_2 \alpha (1+\alpha)^{n-1}}{\frac{L}{(1+\gamma)^n} + (1+\alpha)^n}$$

K_S = Substratkonstante
S = Substratkonzentration
K_A = Dissoziationskonstante des Effektors
A = Effektorkonzentration
n = Anzahl der Untereinheiten
$\alpha = S/K_S \quad \gamma = A/K_A \quad \beta_1 = R/R\,(E) + R \quad \beta_2 = (1-\beta_1)$

Nach diesem Modell setzt sich die unter den entsprechenden Versuchsbedingungen erreichte Maximalgeschwindigkeit V_M aus dem Michaelis-Menten Anteil (V_{MM}) und dem allosterischen Anteil (V_{all}) zusammen. Die Analyse der experimentell erhaltenen Kurven sollte durch Iterationsverfahren mit Hilfe eines Computers möglich sein, so daß die Verhältnisse V_{MM}/V_M bzw. V_{all}/V_M bestimmt werden können. Diese Verhältnisse sollten den Verhältnissen β_1 bzw. β_2 entsprechen. Dies wäre eine Möglichkeit, β_1 bzw. β_2 zu bestimmen.

Mit einer für den Spezialfall nur eines Aktivators, $\beta_1 = \beta_2 = 0.5$ und $n = 2$ angenommenen vereinfachten Gleichung

$$\frac{v}{V_M} = 0.5 \frac{\alpha}{1+\alpha} + 0.5 \frac{\alpha (1+\alpha)}{\frac{L}{(1+\gamma)^2} + (1+\alpha)^2}$$

erhält man die in Abb. 39 a,b,c dargestellten Kurven.

Über die Größe n, die angibt, wie viele Monomere zu Oligomeren assoziiert sind, ist bisher nichts genaues bekannt. Es ist auch noch nicht bekannt, welche der beiden Bindungsstellen des Nukleotid bindenden Proteins für die Wirkung der Nukleotide auf die Adenylat Cyclase verantwortlich ist.

Die Wirkung von Hormonen besteht nach dem Modell darin, daß sie über ihren Rezeptor n vergrößern, d.h., die Adenylat Cyclase in Assoziation mit dem Nukleotid bindenden Protein zu größeren Einheiten zusammenfügen. Dadurch wird die Cooperativität in Gegenwart von Nukleotiden erhöht und V_M gesteigert.

Wird"n" sehr groß, so könnte man annehmen, daß der Adenylat Cyclase Komplex in der Art eines "Cooperativen Membrangitters" vorliegt (115,116). Folglich könnte die stärkere Wirkung von GMP-PNP im Vergleich zu ATP darauf beruhen, daß GMP-PNP die Assoziation von Untereinheiten stärker beeinflußt und dadurch eine größere cooperative Wirkung ausüben kann. Dies erscheint möglich, da GMP-PNP außer den ATP Bindungsstellen mehr und andere Bindungsstellen besetzen kann.

Ableitung der Beziehung $P_1 = P_2RL/P_3T$:

für die Verhältnisse L, P_1 , P_2 , P_3 gelten folgende Beziehungen:

$L = T\,[E] / R\,(E)$ $\quad P_2 = T \times [E] / T\,[E]$

$P_1 = R \times (E) / R\,(E)$ $\quad P_3 = [E] / (E)$

[E] in P_2 kann man ersetzen durch $[E] = P_3 \times (E)$ und man erhält

$P_2 = T \times P_3 \times (E) / T\,[E]$

$T\,[E]$ kann ersetzt werden durch $T\,[E] = R\,(E) \times L$ das ergibt

$P_2 = T \times P_3 \times (E) / R\,(E) \times L$

Wird $R\,(E)$ ersetzt durch $R\,(E) = R \times (E) / P_1$ ergibt sich für

$P_2 = T \times P_3 \times P_1 / R \times L$

daraus erhält man für P_1 die og. Beziehung.

Welche der experimentellen Ergebnisse stimmen mit dem Modell überein?

1) das Modell fordert in der 1/v gegen 1/S Darstellung das Auftreten der Substratsättigung und zwar früher, als nach Michaelis-Menten zu erwarten wäre. Wenn die ki-

netischen Untersuchungen bei Substratkonzentrationen zwischen 1-1o mM ATP und ausreichender Mg^{++} Konzentration durchgeführt wurde, trat immer diese frühe Substratsättigung ein.
Dieses Abweichen von der Michaelis-Menten Kinetik ist auch dann zu sehen, wenn bei niederen Substratkonzentrationen die Meßpunkte auf einer Geraden liegen und Michaelis-Menten Kinetik andeuten.
Diese vom normalen Verlauf abweichende Substratsättigung wurde auch in anderen Untersuchungen im selben Konzentrationsbereich festgestellt (29,64,1o4). Sie wurde entweder nicht beachtet oder als Substrathemmung gedeutet.

2) Der nach dem Modell erhaltene Kurvenverlauf stellt den Verlauf experimenteller Kurven im Prinzip richtig dar.

3) Die sog. basale Aktivität der Adenylat Cyclase ist großen Schwankungen unterworfen. Nach dem Modell beruht die basale Aktivität auf den Formen R (E) und R, deren Anteil abhängig von der Vorgeschichte des Gewebes sein kann.

4) Der in allen Versuchen nahezu übereinstimmende K_M von o.11 mM, die Übereinstimmung der veröffentlichten K_M-Werte und die Wirkung der Effektoren nur auf V_M, sprechen für <u>eine</u> katalytische Einheit.

5) Das Modell bietet alle Möglichkeiten, die zwischen reinem Michaelis-Menten und reinem allosterischen Verhalten liegen.

6) Wenn E das Nukleotid bindende Protein darstellt, so erklärt sich auch der cooperative Effekt, wenn ATP

in hohen Konzentrationen als Substrat und Effektor vorhanden ist.

7) Die Dissoziation von R (E) und T [E] in R bzw. T und (E) bzw. [E] steht in Übereinstimmung mit der Ablösung des Nukleotid bindenden Proteins durch hypotones Medium.

8) Die Zunahme der ATP Bindungsstellen mit steigender Temperatur bei konstantem K_A, wenn das Gleichgewicht noch nicht erreicht ist, kann in Übereinstimmung stehen mit einem schnelleren [E]↔(E) Übergang bei erhöhter Temperatur. Die Zunahme spezifischer Bindungsstellen mit steigender Temperatur kann allerdings sonst nur schwer erklärt werden.

9) Die Ergebnisse aus der Beschallung der partikulären Adenylat Cyclase Präparation zeigen zwei wesentliche Unterschiede im Verhalten der Adenylat Cyclase gegen Effektoren. Die "basale", F^- und Hormon stimulierten Aktivitäten nehmen nach einer e-Funktion ab, die durch Mn^{++} stimulierte Aktivität aber hat einen völlig anderen Verlauf. Mn^{++} wirkt wahrscheinlich über das Nukleotid bindende Protein (es erhöht wie GMP-PNP bei der solubilisierten Adenylat Cyclase die Zahl der Bindungsstellen für ATP) und liefert zunächst mehr R (E) aus T [E] nach als an R oder R (E) durch die Beschallung inaktiviert werden. Das setzt voraus, daß die inaktiven Formen stabiler als die aktiven sind. Die Hormone, die nicht die Umwandlung T [E] in R (E) bewirken können, zeigen somit eine der R (E) Abnahme parallel verlaufende Verminderung der Wirksamkeit. Die F^- Wirkung sollte demnach wenigstens teilweise auf R oder R (E) sein.

10) Die Abhängigkeit der Hormonwirkung von der Substratkonzentration, meist erklärt durch Verunreinigung des ATP mit GTP, wird durch das Modell verständlich, da ATP durch Bindung an das Nukleotid bindende Protein die Aktivität der Adenylat Cyclase beeinflußt.

11) Adenosin verändert das Michaelis-Menten Verhalten der partikulären Adenylat Cyclase in eine nicht lineare Kinetik. Es wurde gezeigt (allerdings bei der gelösten Präparation), daß Adenosin die ATP Bindung hemmt. Über diesen Effekt könnte auch die Hemmung der Adenylat Cyclase Aktivität bei niederen Adenosin Konzentrationen erfolgen.
Ob dieser Wirkung des Adenosins auch eine physiologische Bedeutung zukommt, erscheint hier nicht so wesentlich. Wichtig ist, daß die Adenylat Cyclase sowohl der partikulären Membranpräparation wie auch der löslich gemachten Präparation, wenn auch unter verschiedenen Bedingungen, gleiches kinetisches Verhalten zeigen.

12) Bei allosterischen Proteinen bestimmt die Größe L den Kurvenverlauf. Bei einer konstanten Substratkonzentration kann ein Enzym daher ganz verschiedene Aktivitäten zeigen, bei großem L geringe, bei kleinem L hohe Aktivität.
Auf die Adenylat Cyclase übertragen heißt dies, daß bei großem L die Rezeptoren durch Hormone zwar auch besetzt werden, da das Enzym aber in der inaktiven Form vorliegt, können sie keine Wirkung entfalten. Diese Rezeptoren könnten die beschriebenen und sog. "spare oder silent" Rezeptoren darstellen.

Obwohl also einige experimentelle Ergebnisse mit dem Modell in Übereinstimmung stehen, ist dies noch kein Be-

weis für dessen Richtigkeit. Es bietet aber die Möglichkeit, vereinfachende Annahmen zu machen und gezielte weitere Experimente durchzuführen um das Modell zu bestätigen oder zu modifizieren.

Abb. 39 a-e Theoretische Kurve für das Verhalten eines Enzyms, das sowohl Michaelis-Menten als auch allosterische Eigenschaften besitzt. Die Kurven wurden nach der vereinfachten Gleichung

$$\frac{v}{V_M} = \frac{\beta_1 \alpha}{1+\alpha} + \frac{\beta_2 (1+\alpha)\alpha}{\frac{L}{(1+\gamma)^2} + (1+\alpha)^2}$$

mit $\alpha = S/K_S$ $\gamma = A/K_A$ $K_S = 1o^{-4}M$ $K_A = 1o^{-8}M$

$L = 1o^{14}$ $V_M = 2$ U $\beta_1 = \beta_2 = o.5$ berechnet.

Die Werte für K_S und K_A sind die gerundeten experimentellen Ergebnisse.
S, β_1, β_2 und L sind willkürlich gewählt.

Da L in diesem Fall keine unabhängige Größe ist, sondern von P_1, P_2, P_3, R und T abhängt, erscheint der angenommene Wert nicht zu hoch.

a) zeigt die Komponenten mit Michaelis-Menten (-----) und allosterischem Verhalten (————). Die (– – –) Linie ist die aus beiden resultierende Kurve in der v gegen S Darstellung.

b) ist die Darstellung der Komponenten und der Summe im Lineweaver-Burk Diagramm.

c) zeigt vergrößert den gekrümmten Teil (– – –) der Kurve von b).

d) zum Vergleich Abb. 17d.

e) zum Vergleich Abb. 19.

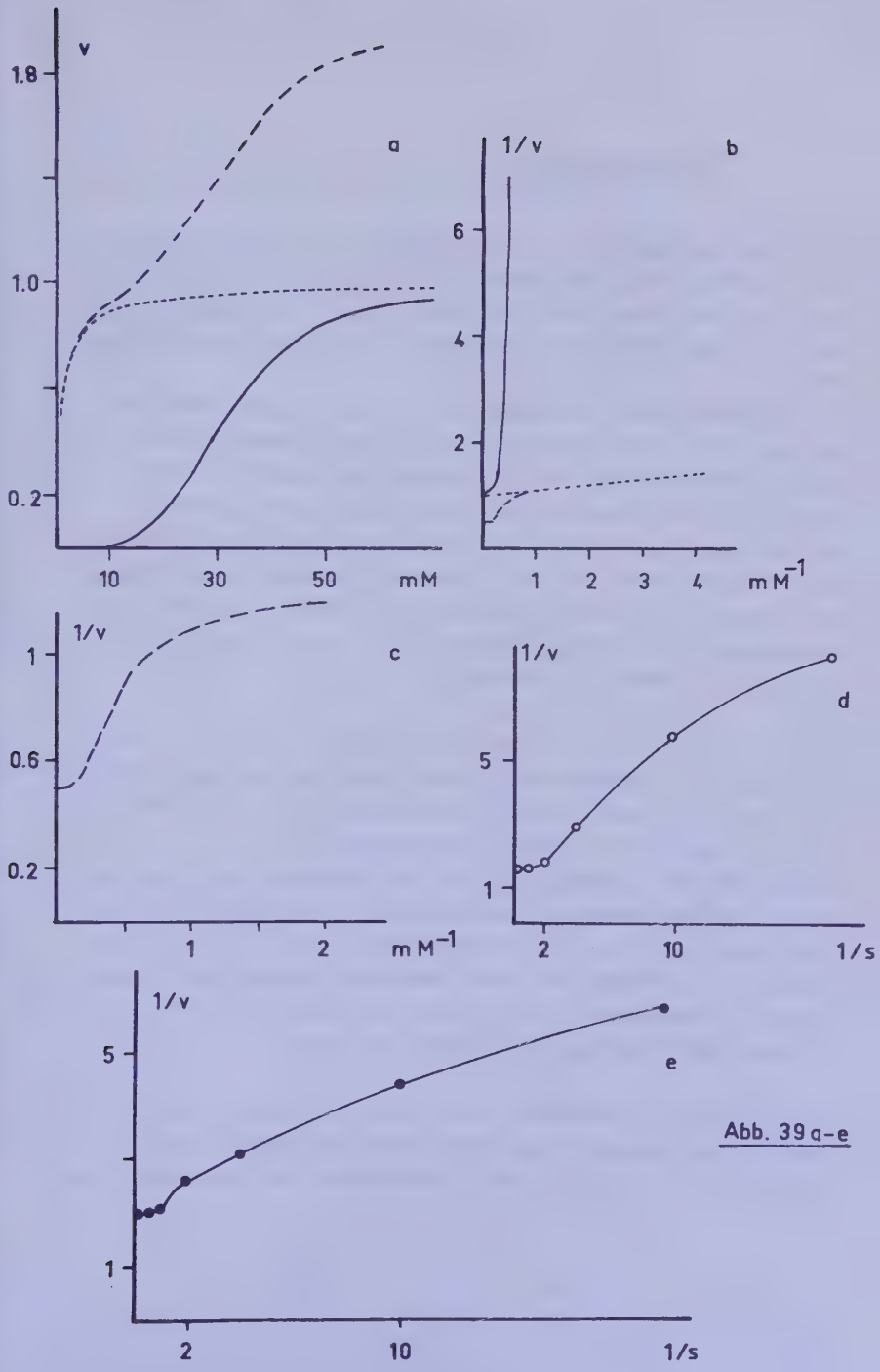

v
1.8
1.0
0.2
a
10
30
50
mM
1/v
b
6
4
2
1
2
3
4
mM⁻¹
1/v
1
0.6
0.2
c
1
2
mM⁻¹
1/v
d
5
1
2
10
1/s
1/v
5
e
1
2
10
1/s

Abb. 39 a–e

5. Zusammenfassung

Die Untersuchungen der Enzymsysteme, die an der Bildung und am Abbau des cAMP beteiligt sind, der Adenylat Cyclase und der Phosphodiesterasen, führten trotz der Vielzahl der Publikationen noch nicht zu einem einheitlichen Bild.
Die verschiedenen Isoformen der Phosphodiesterasen verhalten sich in voneinander abweichenden Präparationen und in Abhängigkeit von der Substratkonzentration unterschiedlich gegen auf sie einwirkende Effektoren.
Da nur sehr wenig über die Verteilung der Phosphodiesterasen in der Zelle, ob frei oder membrangebunden, bekannt ist, kann noch nicht von einem im zellfreien System gefundenen Regulationsmechanismus auf dessen Bedeutung in der Zelle geschlossen werden.

Für die Regulation der Adenylat Cyclase Aktivität, die von zahlreichen Effektoren beeinflußt werden kann, wird ein Modell vorgeschlagen, mit dem eine Reihe experimenteller Ergebnisse erklärt werden können.
Es besteht im wesentlichen aus der Annahme, daß die Adenylat Cyclase in einer inaktiven und einer aktiven Form vorliegen kann. In beiden Zuständen kann sie mit einem Nukleotid bindenden Protein assoziiert sein. Über dieses Nukleotid bindende Protein kann die inaktive Adenylat Cyclase durch Nukleotide aktiviert werden.

Die Wirkung von Hormonen soll darin bestehen, daß sie über ihren Rezeptor die Assoziation mehrerer Komplexe, bestehend aus der Adenylat Cyclase und dem Nukleotid bin-

denden Protein, fördern und dadurch die cooperative Wechselwirkung der Komponenten erhöhen.

Es wurde außerdem wahrscheinlich gemacht, daß zur Erklärung der Wirkung einiger Effektoren sowohl auf die Phosphodiesterasen als auch auf die Adenylat Cyclase eine funktionsfähige Zellmembran erforderlich ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Cook, H.W., Lipkin, D., Markham, R., (1957)
   J. Am. Chem. Soc. 79, 36o7
2. Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J., (1957)
   J. Biol. Chem. 224, 463
3. Sutherland, E.W., Rall, T.W., (1957)
   J. Am. Chem. Soc. 79, 36o8
4. Rall, T.W., Sutherland, E.W., (1958)
   J. Biol. Chem. 232, 1o65
5. Sutherland, E.W., Rall, T.W., (1958)
   J. Biol. Chem. 232, 1o77
6. Butcher, R.W., Sutherland, E.W., (1962)
   J. Biol. Chem. 237, 1244
7. Rall, T.W., Sutherland, E.W., (1962)
   J. Biol. Chem. 237, 1228
8. Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T. (1962)
   J. Biol. Chem. 237, 122o
9. Murad, F., Chi, Y.M., Rall, T.W., Sutherland, E.W.,
   (1962), J. Biol. Chem. 237, 1233
1o. Klainer, L.M., Chi, Y.M., Freidberg, S.L.,
   Rall, T.W., Sutherland, E.W., (1962)
   J. Biol. Chem. 237, 1239
11. Manganiello, V., Vaughn, M., (1973)
   J. Biol. Chem. 248, 7164
12. Lovell-Smith, C.J., Manganiello, V., Vaughn, M.,
   (1977), Biochim. Biophys. Acta 497, 447
13. Gale, H., Guidotti, A., Costa, E., (1977)
   Science 195, 5o3
14. Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W.,
   (1968) Ann. Rev. Biochem. S. 149

15. Birnbaumer, L., (1973)
Biochim. Biophys. Acta 3oo, 129
16. Rutten, W.J., de Pont, J., Banting, S.L., (1972), Biochim. Biophys. Acta 274, 2o1
17. von Hungen, K., Roberts, S., (1974)
Reviews of Neuroscience 1, 231
18. Rodbell, M., Krans, H.M.J., Pohl, S.L., Birnbaumer, L., (1971), J. Biol. Chem. 246, 1872
19. Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J., (1971), J. Biol. Chem. 246, 1877
2o. Schramm, M., Rodbell, M., (1975)
J. Biol. Chem. 25o, 2232
21. Spiegel, A.M., Aurbach, G.D., (1974)
J. Biol. Chem. 249, 763o
22. Sevilla, N., Steer, M.L., Levitzki, A., (1976)
Biochem. 15, 3493
23. Pfeuffer, T., Helmreich, E., (1975)
J. Biol. Chem. 25o, 867
24. Krishna, G., Harwood, J.P., (1972)
J. Biol. Chem. 247, 2253
25. Wolff, J., Cook, G.H., (1973)
J. Biol. Chem. 248, 35o
26. Bockaert, J., Roy, C., Jard, S., (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7o73
27. Harwood, J.P., Löw, H., Rodbell, M., (1973)
J. Biol. Chem. 248, 6239
28. Schultz, J., (1975)
Abstracts in 5th International Meeting of the International Society for Neurochemistry S. 21o
29. Stolc, V., (1977) J. Biol. Chem. 252, 19o1
3o. Steer, M.L., Levitzki, A., (1975)
J. Biol. Chem. 25o, 2o8o
31. Teo, T.S., Wang, J.H., (1973)
J. Biol. Chem. 248, 595o

32. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K., (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 7o, 3526
33. Robison, G.A., Exton, J.H., Park, C.R., (1967) Fed. Proc. 26, 257
34. Schultz, J., Hamprecht, B., Daly, J.W., (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 1266
35. Shimizu, H., Creveling, C.R., Daly, J.W., (197o) Mol. Pharm. 6, 184
36. Huang, H., Shimizu, H., Daly, J.W., (1971) Mol. Pharm. 7, 155
37. Schultz, J., Daly, J.W., (1973) J. Biol. Chem. 248, 843
38. Schultz, J., Daly, J.W., (1973) J. Biol. Chem. 248, 853
39. Schultz, J., Daly, J.W., (1973) J. Biol. Chem. 248, 86o
4o. Huang, M., Shimizu, H., Daly, J.W., (1972) J. Med. Chem. 15, 462
41. Kakiuchi, S., Rall, T.W., McIlwain, H., (1969) J. Neurochem. 16, 485
42. Schultz, J., Daly, J.W., (1973) J. Neurochem. 21, 573
43. Hirata, M., Hayaishi, O., (1965) Biophys. Biochem. Res. Com. 21, 361
44. Teshima, Y., Kakuichi, S., (1974) Biophys. Biochem. Res. Com. 56, 489
45. Chasin, M., (1971) Fed. Proc. 3o, 1268
46. Pöch, G., (1971) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 268, 272
47. Krishna, G., Weiss, B., Brodie, B.D., (1968) J. Pharmacol. Exp. Ther. 163, 379
48. Cheung, W.Y., (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 3o3

49. White, A.A., Zenser, T.V., (1971)
Analyt. Biochem. 41, 372
5o. Ramachandran, J., (1971) Analyt. Biochem. 43, 227
51. Gilman, A.G., (197o)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 67, 3o5
52. Schwabe, U., Ebert, R., Schönhöfer, P.S., (1974)
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac.
286, 83
53. Schultz, J., (1974) Pharm. Res. Com. 6, 335
54. Schultz, J., Hamprecht, B., (1973) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 278, 215
55. Scatchard, G., (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 66o
56. Schultz, J., (1975) J. Neurochem. 24, 1237
57. Uzunov, P., Shein, H.M., Weiss, B., (1974)
Neuropharmacol. 13, 377
58. Clark, R.B., Seney, M.N., (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4239
59. Newman, M., McIlwain, H., (1977)
Biochem. J., 164, 131
6o. Schultz, J., (1975) J. Neurochem. 24, 495
61. Manganiello, V.C., Vaughan, M., (1976)
J. Biol. Chem. 251, 62o5
62. de Haen, C., (1974) J. Biol. Chem. 249, 2756
63. Salomon, Y., Lin, M.C., Londos, C., Rendell, M., Rodbell, M., (1975) J. Biol. Chem. 25o, 4239
64. Lefkowitz, R.J., (1974)
J. Biol. Chem. 249, 6119
65. Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Rodbell, M., (1969)
J. Biol. Chem. 244, 3468
66. Cleland, W.W., Gross, M., Falk, J.E., (1973)
J. Biol. Chem. 248, 6541
67. Garbers, D.L., Johnson, R.A., (1975)
J. Biol. Chem. 25o, 8449

68. Bertrand, H.A., Masoro, J., Ohnishi, T., Yu, B.P., (1971) Biochem. 10, 3679
69. Ohnishi, T., Masoro, J., Bertrand, H.A., Yu, B.P., (1972) Biophys. J. 12, 1251
70. Weder, H.G., Schildknecht, J., Lutz, R.A., Kesselring, P., (1974) Eur. J. Biochem. 42, 475
71. Klotz, J.M., Hunston, D.L., (1971) Biochem. 10, 3065
72. Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J., (1974) J. Biol. Chem. 249, 2249
73. Rosenthal, H.E., (1967) Anal. Biochem. 20, 525
74. Lin, M.C., Salomon, Y., Rendell, M., Rodbell, M., (1975) J. Biol. Chem. 250, 4246
75. Rendell, M., Salomon, Y., Lin, M.C., Rodbell, M., Bermann, M., (1975) J. Biol. Chem. 250, 4253
76. Bockaert, J., Roy, C., Rajerison, R., Jard, S., (1973) J. Biol. Chem. 248, 5922
77. Levitzki, A., Atlas, D., Steer, M.L., (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 2773
78. Atlas, D., Hanski, E., Levitzki, A., (1977) Nature 268, 144
79. Brostrom, M.A., Brostrom, C.O., Breckenridge, B.M., Wolff, D.J., (1976) J. Biol. Chem. 251, 4744
80. Brostrom, C.O., Brostrom, M.A., Wolff, D.J., (1977) J. Biol. Chem. 252, 5677
81. Brostrom, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B.M., Wolff, D.J., (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 64
82. Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y., (1974) J. Biol. Chem. 249, 59
83. Leray, F., Chambaut, A.M., Hanoune, J., (1972) Biophys. Biochem. Res. Com. 48, 1385

84. Londos, C., Salomon, Y., Lin, M.C., Harwood, J.P., Schramm, M., Wolff, J., Rodbell, M., (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 3o87

85. Kimura, N., Nagata, N., (1977) J. Biol. Chem. 252, 3829

86. Schultz, J., Daly, J.W., (1973) J. Neurochem. 21, 1319

87. Haslam, R.J., Lynham, J.A., (1972) Life Sciences, 11, 1143

88. Blume, A.J., Foster, C.J., (1975) J. Biol. Chem., 25o, 5oo3

89. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951) J. Biol. Chem. 193, 265

9o. Hagemann, D., (1974) Diplomarbeit, Tübingen

91. du Moulin, A., Schultz, J., (1975) Experientia 31, 883

92. Kakiuchi, K., Ra.., T.W., McIlwain, H., (1969) J. Neurochem. 16, 485

93. Pichard, A.L., Cheung, W.Y., (1976) J. Biol. Chem. 251, 5726

94. Erneux, C., van Sande, J., Dumont, J.E., Boeynaems, J.M., (1977) Eur. J. Biochem. 72, 137

95. Bevers, M.M., Smits, R., van Rijn, J., van Wijk, R., (1974) Biochim. Biophys. Acta 341, 12o

96. Beer, B., Chasin, M., Clody, D.E., Vogel, J.R., Horovitz, Z.P., (1971) Science 176, 428

97. Berndt, S., Schwabe, U., (1973) Brain Res. 63, 3o3

98. Schultz, J., (1974) J. Neurochem. 22, 685

99. Wolff, D.J., Poirier, P.C., Brostrom, C.O., Brostrom, M.A., (1977) J. Biol. Chem. 252, 41o8

1oo. Uzunov, P., Weiss, B., (1972) Biochim. Biophys. Acta 248, 22o

1o1. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K., Miyamoto, E., (1975) Biochem. J. 146, 1o9

1o2. Fink, A.L., Ahmed, A.J., (1976) Nature 263, 294
1o3. Segel, J.H., (1975) Enzyme Kinetics Wiley Interscience S. 44o-443
1o4. Rodbell, M., (1975) J. Biol. Chem. 25o, 5826
1o5. Chasin, M., Harris, D.N., Phillips, M.B., Hess, S.M., (1972) Biochem. Pharmacol. 21, 2443
1o6. Schultz, J., Kleefeld, G., (1975) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 287, 289
1o7. Wolff, J., Cook, G.H., (1977) J. Biol. Chem. 252, 687
1o8. Huang, M., Daly, J.W., (1972) J. Med. Chem. 15, 458
1o9. de Gubareff, T., Sleator, W., (1965(J. Pharm. Exp. Ther. 148, 2o2
11o. Guthrie, J.R., Nayler, W.G., (1967) Arch. Int. Pharmacodyn. 17o, 249
111. Schrader, J., Rubio, R., Berne, R.M., (1975) J. Mol. Cell. Card. 7, 427
112. Pfeuffer, T., (1977) J. Biol. Chem. 252, 7224
113. Najjar, V.A., Constantopoulos, A., (1973) Mol. Cell. Biochem. 287, 87
114. De Lorenzo, R.J., Freedman, S.D., (1978) Biophys. Biochem. Res. Com. 8o, 184
115. Changeux, J.P., Thiery, J., Tung, Y., Kittel, C., (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 335
116. Blumenthal, R., Changeux, J.P., Lafever, R., (197o) J. Mem. Biol. 2, 351

7. Abkürzungen

cAMP	cyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphat
GMP-PNP	Guanylylimidodiphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PDE	Phosphodiesterase
CDR	Calcium abhängiges Regulator Protein (Calcium Dependent Regulator Protein)
DTT	Dithiothreit
IBMX	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
SDS	Natrium Dodecylsulfat
TSH	Thyreotropin
LH	Luteinisierendes Hormon
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
RO 2o-1724	4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinon
SQ 66-oo7	5-Acetyl-4-(sek. butylamino)-1-äthyl-1H-pyrazolo(3,4-b) pyridin
SQ 2o-oo9	1-Äthyl-4-isopropyliden-hydrazino-1H-pyrazolo(3,4-b) pyridin-5-cabonsäureäthylester
PPO	3,5-Diphenyloxazol

L e b e n s l a u f

Am 27. September 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Hans du Moulin und seiner Ehefrau Leoni geb. Benner in Freiburg/Brsg. geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Freiburg von 1950 - 1956 trat ich in das dortige Kepler-Gymnasium ein.
Im Mai 1958 wechselte ich zum Gymnasium in Triberg, an dem ich 1966 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Das Studium habe ich mit der Diplomprüfung im September 1973 abgeschlossen.
Die Arbeit zu der vorliegenden Dissertation -begonnen im Mai 1974 und abgeschlossen im Wintersemester 1977/78- wurde am Institut für Toxikologie und am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. J. Schultz durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:		G. Weitzel
Physikalische Chemie	:	W. Braun, H. Mauser
Anorganische Chemie	:	W. Rüdorff
Organische Chemie	:	E. Müller, E. Bayer
Physiologie	:	R. Jacob
Botanik	:	E. Bünning

Physik	:	K. Krüger
Anatomie	:	K. Mörike
Pharmakologie	:	H. Remmer
Zoologie	:	K. G. Grell, V. Schwartz
Mathematik	:	W. Schweizer
Genetik	:	W. Seyffert
Mikrobiologie	:	H. Zähner

Herzlich danken möchte ich Herrn G. Melchers, Herrn V. Zarybnicky und Frau L. Schilde-Rentschler, die mich während des Studiums für Ferientätigkeiten in ihre Arbeitsgruppen aufnahmen.